

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, FACULTAD DE QUÍMICA,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E  
INGENIERÍA QUÍMICA

**BIODESULFURACIÓN DE FRACCIONES  
PETROLÍFERAS CON *PSEUDOMONAS  
PUTIDA* CECT5279: OPTIMIZACIÓN DEL  
PROCESO**



MEMORIA QUE PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN QUÍMICA PRESENTA:

RAÚL ALONSO DEL ÁGUILA  
2010

## ***Agradecimientos***

*La realización de una Tesis Doctoral implica un esfuerzo de superación personal, y en el que la mayoría de las ocasiones está lleno de escollos y problemas que parecen insalvables, aunque bien es cierto que muchas veces se solucionan gracias a la ayuda de las personas que están alrededor. Por esa razón, no podría presentar este trabajo sin mencionar aquellas personas que han dejado huella, colaborando de una u otra forma en esta memoria a lo largo de estos años.*

*En primer lugar, debo agradecer a mis directores de Tesis: al Dr. Eloy García-Calvo, por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral, y a la Dra. Karina Boltes Espínola, de forma especial, por su ayuda, por su trato y por todo lo que me ha enseñado acerca de un mundo que era completamente desconocido para mí.*

*Al Dr. Pedro Letón García, por la ayuda que me ha mostrado en los momentos importantes de esta Tesis, al comienzo y al final de este trabajo.*

*Al Dr. Antonio Rodríguez, por su confianza y por darme la oportunidad de aprender más cosas al margen de esta Tesis, por su ayuda y exigencia en los momentos más duros de trabajo.*

*Por otra parte, a lo largo de este tiempo han pasado muchas personas por el Departamento, por lo que todos han dejado su pequeña huella, y a las que debo agradecer su pequeña aportación, como son Cristina C., Ainhoa, Sole, Mar, David, José Benito, Carol, José Antonio, Alice, Guadalupe, José, Toñi, Roberto, José Luis, Abraham, y ya en los últimos tiempos, a Javier, Alejandro, Sara, Cristina y Ana.*

*Gran parte de este trabajo se ha llevado a cabo en la Planta Piloto de Química Fina de la UAH, por la que a lo largo de estos años han pasado muchas personas a las que también quiero agradecer su aportación, como son Alicia, Sara, Oscar, Imanol, Ana, Patxi, Loli... y muchos otros que han ido apareciendo y desapareciendo a lo largo de este tiempo.*

*También tengo que agradecer al grupo de investigación del Dr. Félix García-Ochoa de la UCM, en concreto a Dra. Victoria Santos y a Javier, por su ayuda en la época en que nuestro bicho andaba más rebelde.*

*No me podría olvidar de Esther y Merche del CNB (Thrombotargets), con las que he compartido momentos de duro trabajo con mis otros “bichos”, y que a base de mucho esfuerzo conseguimos que las cosas salieran adelante.*

*Y por supuesto a mi familia; mis padres, Antonia y Manolo, que siempre están ahí, y que se empeñan en darme todo lo mejor, y que sin duda, nunca hubiera podido llegar hasta aquí sin su confianza y apoyo...a mis hermanos y a mis sobrinillos, Marta y Nacho.*

*Pero sin duda, la persona que se merece mi mayor agradecimiento y reconocimiento, por su saber estar, por su apoyo incondicional desde el principio de los principios, estando siempre a mi lado, por su confianza, por su forma de animarme cada día...Elenita...mi amiga, mi compañera, mi pareja...y es que sin ella a mi lado, esta Tesis no hubiera salido adelante...*

## **RESUMEN**

La emisión de óxidos de azufre procedentes del consumo de combustibles fósiles son los principales responsables de la lluvia ácida y de la contaminación del aire. Por esta razón, la legislación reguladora de la contaminación atmosférica es cada vez más restrictiva, tratando de ese modo, de reducir el límite de azufre en los combustibles.

Actualmente, el proceso más rentable empleado para eliminar el azufre del crudo de petróleo, es conocido como hidrodesulfuración. Utilizando este proceso se pueden reducir los niveles de azufre desde una concentración de partida de 300-500 ppm, hasta unas concentraciones cercanas a 50 ppm. En cambio, las legislaciones existentes en la Unión Europea y Estados Unidos, exigen unos niveles de azufre inferiores a 10 y 30 ppm respectivamente, en combustibles fósiles (diesel y gasolina) para el año 2010. El proceso de hidrodesulfuración convencional requeriría una elevada temperatura y presión, de modo que se encarecería el coste de la reducción de azufre a través de este proceso, ya que sería difícil eliminar las moléculas recalcitrantes como son el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados (Cx-DBT).

Los procesos de biodesulfuración son aquellos en los que se emplean microorganismos como biocatalizadores para eliminar el azufre de los combustibles fósiles. La reducción de contenido de azufre es posible llevarla a cabo de manera selectiva, sin alterar las propiedades del combustible. Además, las condiciones de presión y temperatura son más suaves, por lo que se reduce el consumo energético y con ello los costes de operación del proceso.

En este momento, parece que la forma más rentable de alcanzar los niveles de azufre exigidos por la legislación sería el uso combinado de ambos procesos. De forma, que en una primera etapa se somete la fracción petrolífera a un tratamiento de hidrodesulfuración, y en una etapa posterior, se sometería al proceso de biodesulfuración, eliminándose de forma selectiva los compuestos recalcitrantes que no habrían podido ser eliminados en el proceso de hidrodesulfuración.

En este trabajo se ha estudiado el proceso de biodesulfuración aerobia empleando la cepa *Pseudomonas putida* CECT5279. Esta bacteria es un microorganismo genéticamente modificado, el cual posee los genes *dszA*, *dszB* y *dszC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y el gen *hpaC* de *Escherichia Coli* W, por lo que es capaz de degradar DBT y Cx-DBT a través de la ruta 4S, obteniéndose un producto final libre de azufre.

El trabajo de investigación aborda varios problemas de gran relevancia a la hora de la aplicación industrial del proceso. En primer lugar, se ha estudiado el proceso de producción del biocatalizador en biorreactores de distinta configuración y su escalado. En segundo lugar, se ha realizado el estudio cinético de la degradación de DBT y Cx-DBT a escala de agitador orbital y tanque agitado, utilizando sistemas acuosos y bifásicos en condiciones de *resting cell*. Una vez realizado el estudio de los compuestos modelo se ha llevado a cabo la caracterización y desulfuración de una muestra real de diesel. También se han llevado a cabo distintos estudios orientados a la optimización del proceso de biodesulfuración en *resting cell*, como son: la mejora de los problemas de transferencia entre ambas fases líquidas, la reutilización de las células y de las condiciones de aireación, las cuales han sido aplicadas posteriormente en los ensayos realizados en *resting cell* en las distintas escalas de trabajo.

En el capítulo de estudio de la producción del biocatalizador y escalado, se ha realizado el estudio comparativo del crecimiento del biocatalizador en distintas configuraciones de biorreactores (tanque agitado y *air-lift*), basado en el protocolo propuesto previamente por Martin y col., 2004. En el caso del crecimiento en *air-lift* se han establecido las condiciones de aireación adecuadas, así como la evolución de la capacidad desulfurante del microorganismo con la edad de crecimiento. De forma paralela, se ha realizado un estudio de las condiciones de transporte de aire en el biorreactor *air-lift*, así como la caracterización del consumo de oxígeno del biocatalizador durante el crecimiento.

Por otra parte, debido a que es necesario utilizar una elevada cantidad de biocatalizador en los ensayos de biodesulfuración a escala de tanque agitado, se ha llevado a cabo el escalado del proceso de producción del microorganismo en un biorreactor de 15L. El cambio de escala se ha realizado en base al mantenimiento de

las condiciones de aireación y ha permitido obtener una cantidad suficiente de biocatalizador en un tiempo razonable sin reducir su capacidad desulfurante.

Posteriormente, en el capítulo en el que de biodesulfuración de Cx-DBT, se ha realizado el estudio cinético de la degradación de los compuestos modelo DBT y sus derivados Cx-DBT: 4-metil-DBT, 4,6-dimetil-DBT y 4,6-dietil-DBT, de forma individual y en mezclas, ya que son los compuestos más abundantes que aparecen tras el proceso de hidrodesulfuración. Se ha obtenido parámetros cinéticos que describen la degradación de cada uno de los compuestos azufrados en medio acuoso y bifásico, evaluándose el efecto sobre el proceso global de desulfuración de la presencia de estos compuestos mezclados, así como la concentración y edad del biocatalizador, tanto a escala de agitador orbital como en tanque agitado de 2L.

Además, se han realizado ensayos utilizando una muestra real de hidrodesulfurado procedente de la empresa Repsol. Previamente, ha sido necesario identificar su composición por HPLC-DAD, determinando así la cinética de los compuestos más abundantes. El proceso de biodesulfuración de la muestra hidrodesulfurada, se ha llevado a cabo en las mismas condiciones que los ensayos en medio bifásico comentados anteriormente, y utilizando tanque agitado de 2L como escala de trabajo, describiéndose la cinética de degradación de los compuestos más abundantes y obteniéndose los correspondientes rendimientos de conversión.

En el último capítulo presentan distintos estudios llevados a cabo con el objetivo de mejorar las condiciones de operación del proceso de biodesulfuración. La existencia de problemas de transferencia de DBT desde la fase orgánica hasta el interior celular del microorganismo, está ampliamente descrito en bibliografía por diversos autores, llegando a la conclusión de que se trata de la etapa limitante del proceso de biodesulfuración. Por esa razón, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la adición de distintos surfactantes (Tween 85, Tween 20, SDS y Tritón X-100) y de etanol como disolvente, con el objetivo de mejorar la mezcla, estabilizando la emulsión y mejorar los problemas producidos en el transporte. Tras una serie de estudios preliminares con distintos surfactantes y codisolventes, se determinó aquel que favorecía en mayor medida la reacción de biodesulfuración, y posteriormente se realizó la optimización de su dosis.

En relación con los ensayos anteriormente realizados, y con el objetivo de favorecer la reacción de biodesulfuración, se barajó la posibilidad de adicionar fuentes de carbono extra, los cuales al ser introducidas y metabolizadas en el ciclo de Krebs, sean capaces de producir equivalentes reducidos. De modo, que sean incorporados a la ruta 4S favoreciendo así la actividad enzimática y mejorar la capacidad desulfurante de la bacteria. Por esa razón, se llevaron a cabo ensayos de biodesulfuración en *resting cell* en condiciones acuosas, de DBT y de dos de los intermedios de la ruta 4S, adicionando distintas concentraciones de varios intermedios del ciclo de Krebs (piruvato, citrato y succinato) en agitador orbital. En una etapa posterior y una vez determinada la fuente de carbono que favorecía de forma más importante el proceso de biodesulfuración en condiciones acuosas, se llevó a cabo el estudio de biodesulfuración de DBT en condiciones bifásicas, añadiendo distintas concentraciones de cosustrato.

Otro de los factores que se ha estudiado en este trabajo, es la reutilización del biocatalizador tras sucesivas etapas de biodesulfuración. Para ello, se realizaron tres ciclos consecutivos de desulfuración, recuperando el microorganismo entre las distintas etapas, utilizando como sustratos DBT y dos intermedios de la ruta 4S, en condiciones de *resting cell* y medio acuoso. En otra tanda de experimentos, también se estudió la adición de pulsos de piruvato, para estudiar si mejoraba el rendimiento de desulfuración.

Una vez definidas las condiciones de operación más óptimas para el proceso de biodesulfuración en agitador orbital, estas se utilizaron a escala de tanque agitado. Para completar el estudio en dicha escala, fue necesario determinar el consumo de oxígeno para el mantenimiento y la biodesulfuración.

Posteriormente, se realizó el estudio del suministro de aire sobre el proceso de biodesulfuración de DBT en tanque agitado, en *resting cell* en condiciones bifásicas. De modo, que se ensayaron distintos caudales de aire durante el proceso de biodesulfuración, llevando a cabo el estudio cinético de cada uno de ellos y del rendimiento de desulfuración de DBT. Una vez definidas las mejores condiciones de

operación para DBT en tanque agitado, estas se utilizaron posteriormente para realizar los estudios cinéticos de los derivados alquilados en esta misma escala.



## **SUMMARY**

Sulfur dioxide emissions from fuel combustion are the mayor contributor to the acid rain and air pollution. For that reason governments are increasing their attention on the reduction of the limit of the sulphur content in oil fractions after refining.

Actually, hydrodesulphurization is the most profitable process employ to remove sulphur from crude oil. This process is capable of reducing sulphur limits since 300-500 ppm of inicial concentration until next to 50 ppm. Nevertheless, regulations of UE and USA are demanding sulphur limits lowest than 10 ppm in diesel oil and gasoline on 2010. Conventional HDS process would need a high temperature and pressure conditions to remove recalcitrant molecules such as dibenzothiophene (DBT) and its derivates (Cx-DBT).and it would be much more expensive.

Biodesulphurization is defined as a biological process in which biocatalyst is employed to remove sulphur compounds from oil fractions. These compounds can be converted to a final sulphur free compound, without change fuel properties under mild pressure and temperature conditions, which permits the reduction of the energetic consumption and operative costs.

Currently, it seems that the most profitable way to desulphurize oils is by combined processes, hydrotreating the oil fractions first, following by the biological process. By this option, the recalcitrant compounds could be selectively removed, and 10 ppm of final sulphur content could be achieved, according to law restriccions.

In this work, the biodesulfurization process using the GMO *Pseudomonas putida* CECT5279 has been studied. This bacterium carries the genes *dszABC* from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, and the gene *hpaC*. from *Escherichia Coli*. Therefore, it is capable to remove DBT and Cx-DBT following a biochemical route similar to the 4S pathway, which was elucidated for the wild strain *R. erythropolis*.

This work approaches some problems relevant for the industrial application of the biodesulphurization process. The production of the biocatalyst using different bioreactor configurations, as well as, the scale up of the growing process has been carried out. In the same way, kinetics study of resting cell reactions has been conducted for the degradation of DBT and Cx-DBT, using orbital shaker and stirred tank reactor as working scales, both in aqueous and biphasic conditions.

On the other hand, different studies to optimize the biodesulphurization process have been done. These include the improvement of Cx-DBT transfer between aqueous and oil phases, reuse of biocatalyst and characterization and enhancement of the aeration conditions. All of these operational conditions and modification of the reaction media composition for biphasic reactions have been used for the experiments conducted at different working scales with the model oils assayed, as well as or the treatment of a real hydrotreated diesel sample.

On the chapter of the biocatalyst production and scale up of the growing process, a comparative study of the kinetics of the growth has been carried out for two different bioreactor configurations (air-lift and stirred tank reactors), based on the protocol proposed by Martín y col., 2004. For the biomass production using air-lift reactor, it has been studied the aeration conditions to maximize the growth and the evolution of the desulfurization capability with the growing time. Simultaneously, it has been characterized the oxygen mass transfer conditions, and the consumption of oxygen for the biocatalyst along the production process.

On the other hand, due to the high amount of biocatalyst required for biodesulphurization experiments performed in stirred tank reactor, it has been done a scale up of biomass production process until 15L stirred tank bioreactor. This scale up process has been based on the maintenance of the aeration conditions and it has permitted to get enough biocatalyst without losing desulphurization capability.

On the next chapter, it has been studied the kinetics of degradation of DBT and Cx-DBT: 4-methyl-DBT, 4,6-dimethyl-DBT and 4,6-diethyl-DBT, individually and mixed. These model compounds are the most abundant in the last oil fraction before

hydrodesulphurization process. It has been obtained the kinetic parameters that describe the degradation of the Cx-DBT compounds, in aqueous and biphasic reaction media. The effect on the biodesulphurization yield of the presence of several mixtures of sulphur compounds and the cellular age employed for the treatment of them was evaluated as well.

This work includes the characterization and biodesulphurization of a real hydrotreated diesel sample from REPSOL YPF. Using HPLC-DAD, it was identified the more abundant aromatic sulphur compounds. The biodesulphurization of this sample was conducted into a 2L stirred tank reactor using the operational conditions established for the model oil.

In the last chapter it has been presented different issues to improve the resting cell biodesulphurization process. It is recognized that the problem of DBT transfer between liquids layer could be the limiting step of the biodesulphurization process. For that reason, it has been studied the influence of the addition of several surfactants (Tween 85, Tween 20, SDS and Triton X-100) and ethanol as co-solvent. With the aim to enhance the sulphur compound bioavailability, stabilizing the emulsion and reducing the mass transfer problems. It has been established the best surfactant, and the dosage to be used to increase the biodesulphurization yield.

In relation to these assays for the enhancement of biodesulphurization process, it was study the possibility of the reducing equivalent regeneration by the addition of several carbon sources into the resting cell reaction media. The evaluation of the use of pyruvate, succinate and citrate for the degradation of DBT and two of their metabolites according to the 4S pathway was assayed in aqueous and biphasic conditions and orbital shaker.

Another factor that it has been studied was the reuse of the biocatalist. It was investigated the possibility of three cycles of biodesulfurization using DBT and two intermediates of the 4S route as substrates, in aqueous phase. As well as, it was evaluated the effect of the addition of pyruvate in the reuse of the biocatalyst.

Once it was established the optimal operational conditions for the biodesulfurization process in orbital shaker, these were used in stirred tank bioreactor to determinate the oxygen consumption both for the cellular maintenance and for the biodesulfurization process of DBT in biphasic reaction media. In the same way, it was evaluated the effect of the air supply on the DBT biodesulphurization yield.

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

<b>1.1. EL PETRÓLEO.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. EXPLOTACIÓN INDUSTRIAL DEL PETRÓLEO.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. CONTAMINACIÓN POR COMBUSTIBLES.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE AZUFRE.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1. Hidrodesulfuración.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.2. Lavados caústicos.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.3. Biodesulfuración.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3.1. Degradación de DBT con ruptura de enlace C-C.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.3.2. Desulfuración de DBT con ruptura de enlace C-S.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5. PROCESOS INDUSTRIALES DE BIODESULFURACIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>1.5.1. Biocatalizadores.....</b>	<b>39</b>
<b>1.5.2. Formas de operación.....</b>	<b>41</b>
<b>1.6. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO.....</b>	<b>47</b>

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>2.1. EQUIPO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1.1. Fermentadores comerciales.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1.1.1. Biorreactor tanque agitado.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1.1.2. Columna de burbujeo de recirculación interna (<i>Air-lift</i>).....</b>	<b>56</b>
<b>2.1.2. Unidad de control del fermentador Biostat® B y C.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1.3. Electrodo de pH.....</b>	<b>58</b>
<b>2.1.4. Electrodo de oxígeno disuelto.....</b>	<b>59</b>
<b>2.1.5. Medidor de flujo másico.....</b>	<b>59</b>

<b>2.2. EQUIPOS AUXILIARES.....</b>	<b>59</b>
2.2.1. Autoclave.....	59
2.2.2. Incubarora orbital.....	59
2.2.3. Campana de flujo laminar .....	60
2.2.4. Balanza de precisión .....	60
2.2.5. Centrífugas.....	60
2.2.6. Microscopios .....	61
2.2.6.1. Microscopio de luz transmitida .....	61
2.2.6.2. Microscopio electrónico de barrido.....	61
<b>2.3. MATERIALES EMPLEADOS. ....</b>	<b>61</b>
2.3.1. Microorganismo .....	61
2.3.2. Reactivos utilizados.....	63
<b>2.4. EQUIPOS DE ANÁLISIS. ....</b>	<b>65</b>
2.4.1. Espectrofotómetro de absorción UV-VIS .....	65
2.4.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) .....	65
2.4.3. Tensiómetro de anillo.....	66
<b>2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>66</b>
2.5.1. Protocolo de conservación y mantenimiento del biocatalizador .....	66
2.5.2. Preparación de muestras de inóculo .....	67
2.5.3. Protocolo de crecimiento en biorreactor .....	68
2.5.4. Análisis de la capacidad desulfurante .....	69
2.5.5. Proceso de biodesulfuración.....	70
2.5.6. Protocolo de preparación de las muestras para su uso en microscopía ...	72
2.5.6.1. Microscopía de luz transmitida .....	72
2.5.6.2. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.) .....	73

<b>2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS .....</b>	<b>74</b>
<b>2.6.1. Análisis de la biomasa.....</b>	<b>74</b>
<b>2.6.2. Determinación de los compuestos objeto de estudio.....</b>	<b>75</b>
<b>2.6.2.1. Análisis de la fase acuosa.....</b>	<b>76</b>
<b>2.6.2.2. Análisis de la fase orgánica .....</b>	<b>79</b>
<b>2.6.2.3. Análisis de los intermedios del ciclo de Krebs .....</b>	<b>81</b>
<b>2.6.3. Análisis cinético del crecimiento y de la biodesulfuración.....</b>	<b>81</b>

## **CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE *Pseudomonas Putida* CECT5279 Y SU ESCALADO**

<b>3.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>3.3. MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO.....</b>	<b>91</b>
<b>3.3. CONSUMO Y TRANSPORTE DE OXÍGENO .....</b>	<b>94</b>
<b>3.3.1. Medida del consumo de oxígeno . .....</b>	<b>95</b>
<b>3.3.2. Medida del transporte de oxígeno .....</b>	<b>99</b>
<b>3.4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>105</b>
<b>3.4.1. Estudio del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en biorreactor tipo <i>air-lift</i> .....</b>	<b>107</b>
<b>3.4.2. Comparación del proceso de producción de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en distintas configuraciones de biorreactor .....</b>	<b>113</b>
<b>3.4.3. Estudio del consumo y transporte de oxígeno en el crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en <i>air-lift</i> .....</b>	<b>118</b>
<b>3.4.4. Escalado de la producción del biocatalizador .....</b>	<b>124</b>
<b>3.4.4.1. Estudio de <math>k_La</math> en tanque agitado de 15L de volumen .....</b>	<b>131</b>
<b>3.4.4.2. Proceso de escalado de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 .....</b>	<b>133</b>

## **CAPÍTULO 4. BIODESULFURACIÓN DE C<sub>x</sub>-DBT EN *RESTING-CELL***

<b>4.1. ESTUDIOS PREVIOS DE LA DESULFURACIÓN DE C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>143</b>
<b>4.2. ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN DE DBT Y C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>147</b>
<b>4.2.1. Modelo cinético en medio acuoso.....</b>	<b>148</b>
<b>4.2.2. Modelo cinético en medio orgánico .....</b>	<b>153</b>
<b>4.3. RESULTADOS DE LA CINÉTICA DE DBT Y C<sub>x</sub>-DBT.....</b>	<b>156</b>
<b>4.3.1. Estudio cinético de la biodesulfuración de DBT .....</b>	<b>159</b>
<b>4.3.1.1. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase acuosa .....</b>	<b>159</b>
<b>4.3.1.2. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase orgánica .....</b>	<b>165</b>
<b>4.3.1.3. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase acuosa .....</b>	<b>168</b>
<b>4.3.1.4. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase orgánica .....</b>	<b>171</b>
<b>4.3.2. Estudio cinético de la biodesulfuración de C<sub>x</sub>-DBT.....</b>	<b>173</b>
<b>4.3.2.1. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase acuosa .....</b>	<b>173</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de C<sub>x</sub>-DBT como único sustrato ...</b>	<b>173</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de mezclas de C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>179</b>
<b>4.3.2.2. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase orgánica .....</b>	<b>183</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de C<sub>x</sub>-DBT como único sustrato ...</b>	<b>183</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de mezclas de C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>187</b>
<b>4.3.2.3. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase acuosa .....</b>	<b>192</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de C<sub>x</sub>-DBT como único sustrato ...</b>	<b>192</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de mezclas de C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>194</b>
<b>4.3.2.4. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase orgánica .....</b>	<b>197</b>
<b>Proceso de biodesulfuración de C<sub>x</sub>-DBT como único sustrato ...</b>	<b>197</b>



Proceso de biodesulfuración de mezclas de Cx-DBT .....	199
<b>4.4. BIODESULFURACIÓN DE UNA MEZCLA HIDRODESULFURADA ..</b>	<b>203</b>
 <b>CAPÍTULO 5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE <i>RESTING-CELL</i></b>	
<b>5.1. EFECTO DE LA ADICIÓN DE SURFACTANTES SOBRE EL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN.....</b>	<b>212</b>
5.1.1. Estudio del efecto de la adición de surfactantes en <i>resting-cell</i> en fase acuosa .....	217
5.1.2. Estudio del efecto de la adición de surfactantes en <i>resting-cell</i> en fase orgánica .....	220
5.1.3. Efecto de Tween 85 en la cinética de la ruta 4S en medio bifásico .....	225
<b>5.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE UNA FUENTE DE CARBONO ADICIONAL.....</b>	<b>228</b>
5.2.1. Estudio de la adición de cosustratos en medio acuoso .....	230
5.2.2. Estudio de la adición de cosustratos en medio bifásico .....	235
<b>5.3. REUTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EN <i>RESTING CELL</i> .....</b>	<b>237</b>
5.3.1. Estudio de la viabilidad celular en condiciones de <i>resting cell</i> .....	238
5.3.2. Estudio de la reutilización de <i>P. putida</i> CECT5279 en condiciones acuosas .....	240
<b>5.4. EFECTO DE LA EDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE EL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN EN CONDICIONES BIFÁSICAS.....</b>	<b>245</b>
<b>5.5. DESULFURACIÓN DE DBT EN <i>RESTING CELL</i> EN TANQUE AGITADO EN CONDICIONES BIFÁSICAS: EFECTO DEL OXÍGENO .....</b>	<b>250</b>
5.5.1. Caracterización del consumo de oxígeno de <i>P. putida</i> CECT5279 en <i>resting cell</i> en condiciones bifásicas.....	250
5.5.2. Efecto del suministro de aire en el proceso de biodesulfuración en <i>resting cell</i> en condiciones bifásicas en tanque agitado.....	254

**CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**

<b>6.1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE <i>P. PUTIDA</i> CECT5279 Y SU ESCALADO.....</b>	<b>261</b>
--	------------

<b>6.2. BIODESULFURACIÓN DE Cx-DBT .....</b>	<b>262</b>
--	------------

<b>6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RESTING CELL .....</b>	<b>266</b>
---	------------

<b>CAPÍTULO 7. NOMENCLATURA .....</b>	<b>271</b>
---------------------------------------	------------

<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>277</b>
---------------------------------------	------------

# **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

<b>1.1. EL PETRÓLEO.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. EXPLOTACIÓN INDUSTRIAL DEL PETRÓLEO.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. CONTAMINACIÓN POR COMBUSTIBLES.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE AZUFRE.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1. Hidrodesulfuración.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.2. Lavados caústicos.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.3. Biodesulfuración .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3.1. Degradación de DBT con ruptura de enlace C-C.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.3.2. Desulfuración de DBT con ruptura de enlace C-S .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5. PROCESOS INDUSTRIALES DE BIODESULFURACIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>1.5.1. Biocatalizadores .....</b>	<b>39</b>
<b>1.5.2. Formas de operación .....</b>	<b>41</b>
<b>1.6. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO .....</b>	<b>47</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los combustibles fósiles son compuestos orgánicos a partir de los cuales se obtiene la mayor parte de la energía utilizada en la sociedad moderna actual, principalmente por la combustión de estos recursos minerales no renovables presentes en la corteza terrestre. Los combustibles fósiles incluyen el carbón, el gas natural y el petróleo. La mayor parte de estos combustibles son utilizados en el transporte, la calefacción y la generación de energía eléctrica.

### **1. 1. EL PETRÓLEO**

Actualmente, el petróleo es la fuente energética primaria más importante de la sociedad actual. El petróleo es un recurso natural no renovable que aporta el mayor porcentaje del total de la energía que se consume en el mundo. La importancia del petróleo no ha dejado de crecer desde sus primeras aplicaciones industriales a mediados del siglo XIX. De hecho, desde principios del siglo XX, el petróleo junto al gas natural, han ido desplazando el uso del carbón como fuente de energía.

El petróleo se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre y se emplea como combustible y materia prima para la industria química, se emplea para fabricar medicinas, fertilizantes, productos alimenticios, objetos de plástico, materiales de construcción, pinturas o textiles y para generar electricidad. Es el más útil y abundante de los combustibles descubiertos por el hombre en la corteza terrestre. Se puede encontrar en estado líquido o gaseoso. En el primer caso es un aceite y en el segundo es conocido como gas natural. Según la teoría más aceptada, el origen del petróleo y del gas natural es de tipo orgánico y sedimentario. Los restos de animales y plantas, cubiertos por arcilla y tierra durante muchos millones de años, sometidos por tanto a grandes presiones y altas temperaturas, junto con la acción de bacterias anaerobias provocan la formación del petróleo.

La palabra "petróleo" significa "aceite de piedra" y su nombre procede etimológicamente de los terminos latinos petro: piedra, oleum: aceite. El petróleo es un líquido oleoso bituminoso de origen natural, inflamable, cuyo color varía de incoloro a negro, y consiste en una mezcla completa de hidrocarburos con pequeñas cantidades de

otros compuestos, como azufre, nitrógeno y oxígeno, junto con trazas de metales, como níquel y vanadio.

En la industria petrolera, el petróleo crudo se refiere a su forma natural no refinado, tal como sale de la tierra. Este está compuesto por una mezcla de gran variedad de aceites minerales o hidrocarburos, y en ocasiones puede existir contaminación de azufre y otras impurezas indeseables. Esta variedad de hidrocarburos forma una serie que va desde el asfalto grueso y pesado, o cera sólida a temperaturas ordinarias, hasta los aceites muy volátiles, tales como los que se encuentran en la gasolina, y técnicamente incluye también hidrocarburos gaseosos bajo presiones suficientemente altas, especialmente metano, acetileno y butano. Estos gases son también líquidos, y bajo las presiones extremadamente altas que son creadas por la naturaleza en el subsuelo, todos estos hidrocarburos se encuentran generalmente presentes al principio en forma de petróleo crudo líquido.

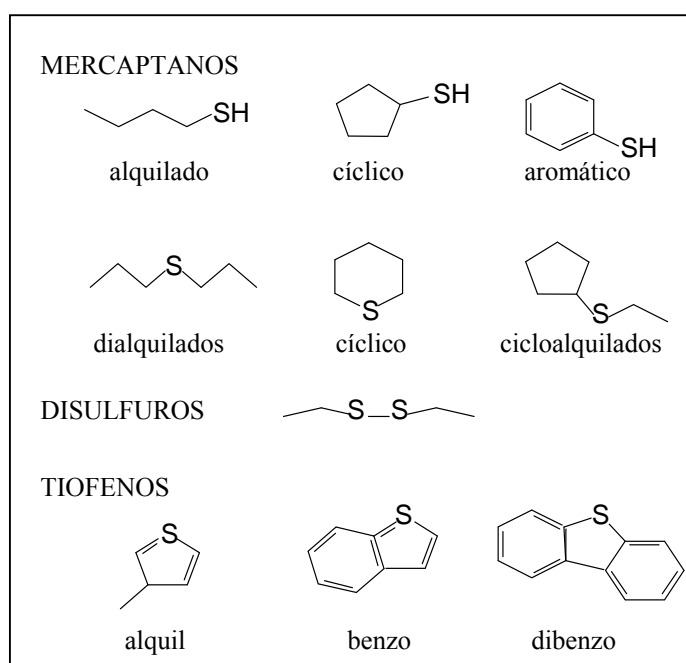
Compuesto	Estado normal	Productos de empleo primario
Metano	Gaseoso	Gas natural combustible/productos petroquímicos
Etano	Gaseoso	
Propano	Gaseoso	GLP/Productos petroquímicos
Butano	Gaseoso	
Pentano	Líquido	Naftas de alto grado
Hexano	Líquido	
Heptano	Líquido	Gasolina natural (sustancia base para combustibles para motores de combustión interna y turbinas)
Octano	Líquido	
Nonato	Líquido	
Decano	Líquido	
Undecano	Líquido	
Dodecano	Líquido	Queroseno
Tetradecano	Líquido	Aceite lubricantes
Eicosano	Sólido	Parafinas

**Tabla 1.1. Componentes mayoritarios del petróleo y su empleo primario (comprende solo hidrocarburos simples a presión atmosférica).**

La proporción de los diferentes hidrocarburos que integran el petróleo crudo varía en cada yacimiento. La composición elemental del petróleo está normalmente comprendida dentro de los siguientes intervalos: 84-87% de C, 11-14% de H, 0-2% de S, 0-2% de N y 0-0.5% de nitrógeno, oxígeno, metales y sales. El contenido de azufre en el petróleo oscila en función de la procedencia del crudo, el compuesto más

abundante después del carbono y del hidrógeno, y cuyo contenido puede variar en un en un rango de 0.03% en peso a valores superiores al 8% (Rall y col., 1972), e incluso al 30% (Kropp y Fredorak, 1998).

Se han identificado al menos 200 compuestos azufrados distintos, incluyendo sulfuros, mercaptanos, tiofenos, alquiltiofenos tetrahidrotiofenos, tiofenoles y benzotiofenos (Brunet y col., 2005).



**Figura 1.1. Estructura química de los compuestos azufrados más abundantes en el crudo.**

La variabilidad del contenido de estos compuestos azufrados depende del yacimiento en el que se ha formado el crudo, así como la madurez del mismo.

Generalmente, los crudos más inmaduros químicamente son ricos en azufre y compuestos azufrados no tiofénicos, mientras que los aceites inmaduros van a contener una mayor proporción de benzotiofenos y dibenzotiofenos alquilados, de elevado peso molecular, siendo estos los que representan la mayor parte del azufre contenido en el crudo.

En cuanto a su composición, el petróleo se clasifica en según el tipo de hidrocarburos que lo componen. Se pueden distinguir tres tipos de petróleo, de base

parafinica, son los más abundantes, tienen color claro, son fluidos y de baja densidad. Cuando son refinados sus aceites lubricantes se separa la parafina, y se pueden obtener grandes cantidades de nafta, keroseno y aceites lubricantes. Los petróleos de base asfáltica, son de color negro, viscoso y de elevada densidad. Estos petróleos son ricos en compuestos cíclicos como ciclopentano y ciclohexano, así como en hidrocarburos aromáticos como el benceno y sus derivados. Por último, los petróleos de base mixta, poseen características y rendimientos intermedios entre las otras dos variedades principales.

Los crudos a su vez, también se clasifican según la densidad API (American Petroleum Institute), siendo esta la densidad medida respecto al agua. En la escala API, el agua posee 10 grados, de manera que un petróleo menos denso que el agua tendrá una API mayor que 10, y uno más denso, tendrá un API menor que 10.

Otras clasificaciones que se pueden utilizar, es atendiendo a sus propiedades físicas, como viscosidad, puntos de fluidez, rangos de destilación, o puntos de inflamación. La medida más completa de la calidad del petróleo incluye otros factores como el contenido de impurezas, la naturaleza química y la curva de destilación.

La unidad empleada por la industria del mercado de petróleo para medir la cantidad de crudo es el barril de petróleo, una unidad de volumen de valor igual a  $158.988 \text{ dm}^3$ . Una tonelada de petróleo equivale aproximadamente a 7-8 barriles.

### ***-Producción y reservas mundiales de petróleo***

Actualmente, las reservas mundiales ascienden a 164500 millones de toneladas, equivalentes a un 1.21 billones de barriles. La mayoría de estas reservas, en torno a un 79.5%, se encuentran localizadas en países pertenecientes a la OPEP (Organización de Países Productores de Petróleo): Arabia Saudita, Argelia, Emiratos Árabes Unidos, Indonesia, Irak, Irán, Kuwait, Libia, Nigeria, Qatar y Venezuela. El 6.6% del total mundial se encuentra en países pertenecientes a la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), formada por 30 países entre los que se encuentran los económicamente más potentes del mundo. El resto, un 13.9%, se encuentra repartido en los demás países del mundo.

En la siguiente tabla se expresan las reservas mundiales por países, en la cual se observa que el Arabia Saudita cuenta con aproximadamente el 21.9 %, e Irán, Irak y Emiratos Árabes tienen la mayor parte de las mismas.

Otro importante centro geográfico de acumulación de reservas petrolíferas es en América, donde destacan Venezuela, Estados Unidos y Méjico.

País	Porcentaje sobre el total de reservas mundiales
Arabia Saudí	21.9
Irán	11.4
Irak	9.5
Emiratos Árabes Unidos	8.1
Kuwait	8.4
Venezuela	6.6
Rusia	6.6
Libia	3.4
Nigeria	3
Estados Unidos	2.5
China	1.3
Méjico	1.1

**Tabla 1.2. Países del mundo con más reservas petrolíferas. Fuente: B.P. Statistical Review of World Energy. Junio 2007.**

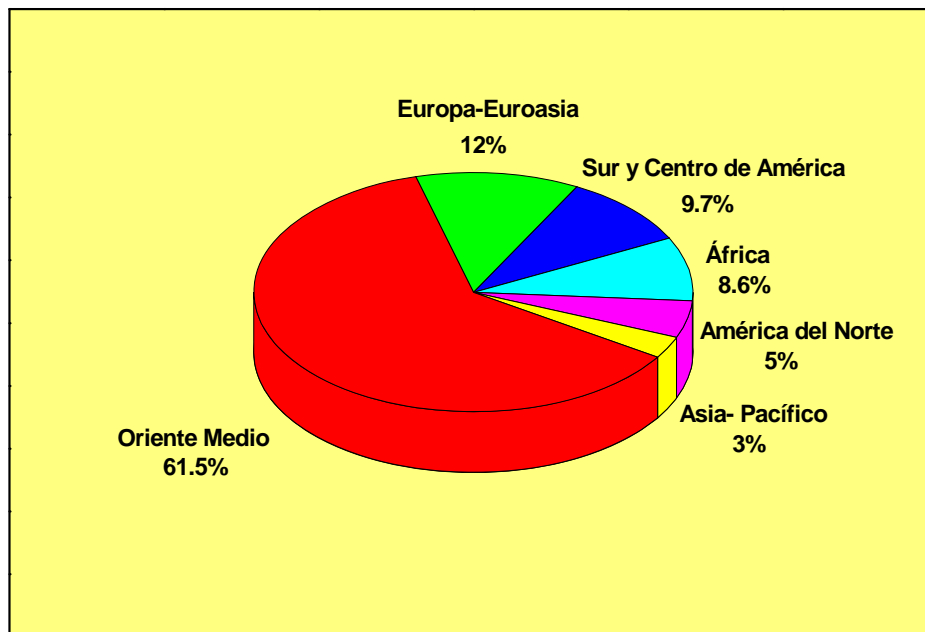
Existen inmensas zonas de origen sedimentario en las que se supone la existencia de grandes yacimientos todavía por explotar, como por ejemplo, en el Ártico, Alaska, Canadá, Groenlandia o Siberia.

Año	Millones de toneladas	Miles de barriles diarios
2006	3.914	81.663
2005	3.897	81.250
2004	3.863	80.224
2003	3.701	77.056
2002	3.576	74.496

**Tabla 1.3. Datos de producción en el período 2002-2006. Fuente: B.P. Statistical Review of World Energy. Junio 2007.**



El dato sobre la producción de barriles de petróleo (Tabla 1.3) es de gran importancia, debido a que permite estimar la duración de las reservas mundiales en caso de que no se efectuasen más descubrimientos. Si la producción y consumo de petróleo se mantiene en el futuro al mismo ritmo que hasta ahora, dichas reservas se agotarían en 40.5 años, salvo que se encontrarán nuevos yacimientos.



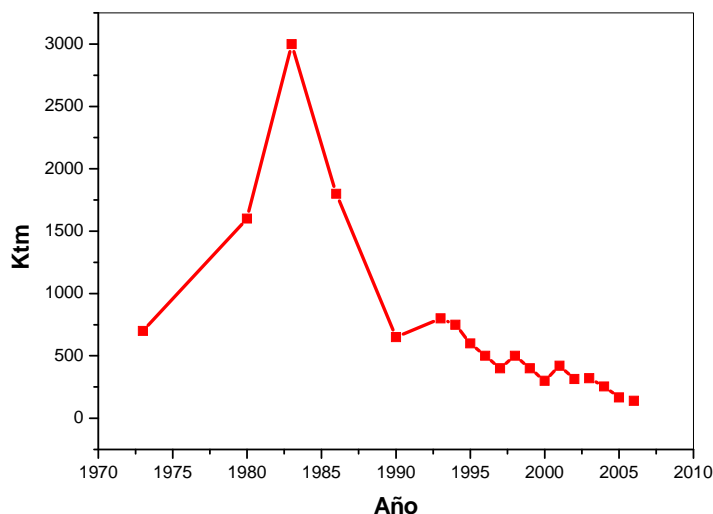
**Figura 1.2. Reservas de petróleo mundial. Desglose por regiones. Fuente: B.P. Statistical Review of World Energy. Junio 2007.**

### ***-Producción y reservas de petróleo en España.***

En España, el grado de autoabastecimiento de productos petrolíferos es prácticamente testimonial, y las previsiones de esta materia tampoco son optimistas, por lo que es poco probable que se realicen descubrimientos que hagan modificar esta situación.

Aunque en España existen yacimientos de petróleo, su producción en 2003 fue sólo de 321.000 toneladas, lo que hace que la práctica totalidad del crudo que se trata en las diez refinerías españolas tenga que ser importado. Estas refinerías están ubicadas en Cataluña, Galicia, País Vasco, Murcia, Andalucía y Canarias, con una capacidad de

refino de crudo superior a 65 Mt/año. Los países que en 2003 suministraron más del 10% del total de petróleo a España fueron Rusia, Méjico, Arabia Saudita, Irán, Libia y Nigeria.



**Figura 1.3. Producción de petróleo en España.**

## ***1.2. EXPLOTACIÓN INDUSTRIAL DEL PETRÓLEO***

El petróleo según es extraído del yacimiento, no posee aplicación alguna. El valor que posee lo va a ir adquiriendo a lo largo de las distintas fases de explotación industrial que se clasifican en: prospección, sondeo, extracción, transporte (por vía marítima y terrestre), refino y petroleoquímica.

El proceso necesario para separarlo en distintas fracciones que sí van a ser de utilidad, se le conoce con el nombre de refino, y este va a estar condicionado según el destino que se fije para los productos finales y va a depender de la constitución molecular del petróleo de partida, también conocida como base del crudo.

Una refinería es una instalación industrial en la cual se va a transformar el petróleo crudo en productos con utilidad para aplicaciones energéticas o de otro tipo. Los procesos de refino son el conjunto de operaciones necesarias para obtener dichos productos, cuya finalidad es la de obtener la mayor cantidad posible de productos de calidad, que incluye las fracciones más ligeras, como gases propano y butano, así como

las aquellas fracciones más pesadas, como fuelóleo y asfaltos, pasando también por otros productos intermedios como gasolinas, gasoil, asfaltos, aceites lubricantes y naftas.

Las fases del refino son:

1. **Destilación fraccionada**, en la cual se separan las distintas fracciones del crudo.
2. **Craqueo**, es la conversión de las fracciones de menor demanda en el mercado en otras de mayor demanda.
3. **Reformado**, en la cual se modifican las estructuras de las cadenas carbonadas de las fracciones para elevar su calidad.
4. **Tratamiento de depuración o refino final**, en el que se van a depurar los productos obtenidos, eliminando los compuestos indeseables.

La destilación fraccionada es la fase fundamental para el refino del petróleo, y se trata de una operación física, en la cual no se producen cambios en la composición química del petróleo.

El petróleo calentado es alimentado a una columna llamada torre de fraccionamiento o de destilación. Esta pasa primero por un calentador, en el que se alcanza una temperatura de 370°C y posteriormente es introducido en una torre, donde comienza a circular y a evaporarse, de esta forma se separa los productos ligeros y los residuos.

Los hidrocarburos con menor masa molecular son los que se van a vaporizar a temperaturas más bajas y a medida que aumenta la temperatura se van a ir evaporando las moléculas más grandes.

Las fracciones más ligeras del crudo, como son los gases y la nafta, ascienden hasta la parte superior de la torre. A medida que descendemos, nos encontramos con los productos más pesados, como el queroseno, gasoil ligero y gasoil pesado.

La destilación es un proceso continuo, en el cual el crudo entra en la torre y las fracciones separadas salen a distintos niveles. Esta operación suministra los productos en bruto, cuya calidad y cantidad es inferior a la demandada por el mercado, por lo que es necesaria una etapa posterior de transformación de las distintas fracciones. Para ello se utilizan técnicas de conversión.

Los principales procedimientos de conversión son el craqueo y el reformado. Son operaciones químicas que van a cambiar la composición de la fracción que alimenta cada proceso.

El proceso de craqueo consiste en una ruptura molecular y generalmente se realiza a través de dos técnicas: el craqueo térmico, que rompe las moléculas mediante calor y craqueo catalítico, que realiza la misma operación pero utilizando un catalizador, con la ventaja que es necesario utilizar menor cantidad de energía. Son utilizados para incrementar la cantidad de gasolina producida.

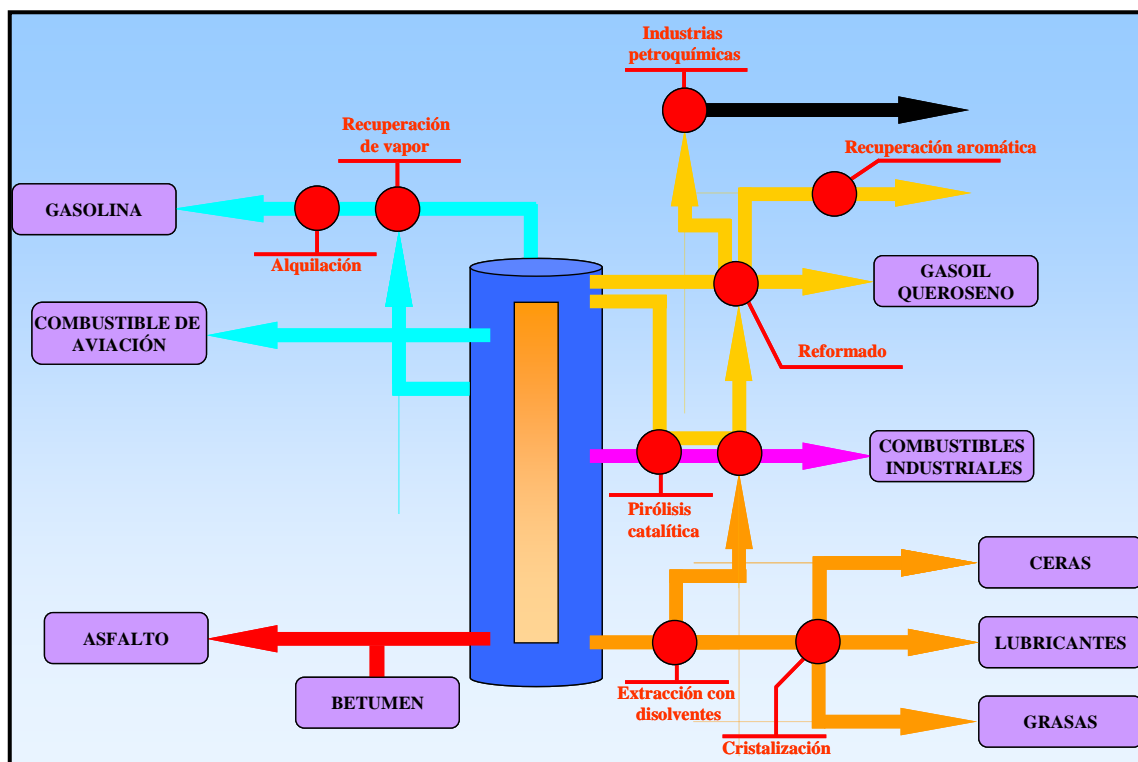
El reformado, es un proceso de conversión, aplicado a componentes más ligeros, el cual permite que la nafta pueda convertirse en presencia de un catalizador (Pt), en componentes de alta calidad para las gasolinas.

En general, los productos obtenidos en los procesos anteriores no pueden considerarse productos finales, por lo que antes de su comercialización deben ser sometidos a procesos para eliminar los compuestos no deseados que los acompañan (generalmente compuestos derivados del azufre) o transformar los productos finales aumentando su pureza.

Los principales tratamientos de depuración pueden clasificarse como refinado químico y físico. El refinado físico, es aplicado generalmente sobre fracciones pesadas, como aceites pesados y residuos de la destilación primaria. Los principales tratamientos son el *desparafinado*, el *desasfaltado*, la *extracción con disolventes* (sistema líquido-líquido), y la *decoloración*.

	Producto	Intervalo T <sup>a</sup> ebullición	Long. Cadena carbonada	Aplicaciones
<b>Fracciones ligeras</b>	Gas de refinería (GLP)	<20°C	C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	Combustible para refinería, calefacción doméstica e industrial.
	Gasolina directa	<20°C	C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub>	
	Nafta pesada	40-150°C	C <sub>5</sub> -C <sub>9</sub>	Carburante para automóviles.
<b>Fracciones medias</b>	Gasolina pesada	150-200°C	C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Materia prima para productos químicos, disolvente.
	Queroseno	170-250°C	C <sub>13</sub> -C <sub>17</sub>	Lámparas de alumbrado, carburante para turborreactores.
<b>Fracciones pesadas</b>	Gas-oil	250-320°C	C <sub>17</sub> -C <sub>20</sub>	Carburante para motores diesel, calefacción doméstica.
	Fuel-oil ligero	340-400°C		Combustible para buques, locomotoras, etc.
	Fuel-oil pesado	400-500°C	C <sub>20</sub> -C <sub>35</sub>	Mat. prima para: lubricantes, ceras y parafinas, cremas, aceites esenciales. Pavimentación, techado, impermeabilización, abrasivos y electrodos.
	Asfaltos	>500°C	>C <sub>35</sub>	

**Tabla 1.4. Fracciones y productos obtenidas por orden de volatilidad y longitud de cadena en la refinería.**



**Figura 1.4. Proceso de refinación de productos derivados del petróleo.**

Por otra parte, el refino químico es aplicado sobre todo en fracciones lubricantes, que son tratadas bien con ácido sulfúrico o bien con lavado álcali. Dentro de este, uno de los principales procesos es el hidrotratamiento, que consiste en una hidrogenación catalítica a presión.

Los catalizadores más utilizados son generalmente mezclas de óxidos de molibdeno y cobalto,  $\text{Mo}_2\text{O}_3$  y  $\text{Co}_2\text{O}_3$  sobre óxido de aluminio,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , que luego reaccionan y forman  $\text{CoMoO}_4$ . Actualmente, este tratamiento es utilizado para varios tipos de gasóleos, debido a las restricciones legales relacionadas con la emisión de compuestos azufrados a la atmósfera. En los casos en que el único objetivo de este proceso sea la eliminación de azufre, a este tratamiento se le denomina hidrodesulfuración.

### ***1.3. CONTAMINACIÓN POR COMBUSTIBLES FÓSILES***

La combustión de productos derivados de los combustibles fósiles, para la generación de energía y para usos más comunes (calefacción, automóvil, etc.), es responsable de grandes problemas medioambientales que son de gran relevancia actualmente, como son la acumulación de gases invernadero, acidificación, contaminación del aire, contaminación del agua, daño de las capas superficiales y ozono troposférico. Estos problemas medioambientales son causados por la liberación de contaminantes que normalmente están de forma natural presentes en la estructura de los combustibles, como el azufre y el nitrógeno.

El consumo y quemado de combustibles fósiles, producen emisiones de dióxido de carbono al aire, siendo la quema del petróleo la responsable de 30% de estas emisiones. Una acumulación en altos niveles de concentración del dióxido de carbono, permite que parte de la radiación solar llegue a la superficie terrestre, e impide que parte de ella pueda volver al espacio, por lo que es reflejada nuevamente, siendo este el origen del efecto invernadero y de un calentamiento de la temperatura de la atmósfera terrestre, que se relaciona con el cambio climático.

<i>Compuesto</i>	<i>Fuente</i>	<i>Toxicidad</i>
CO	Transporte	Envenenamiento de la sangre (carboxihemoglobina)
No <sub>x</sub>	Combustión a alta temperatura	Irritante
COV	Smog Fotoquímico en presencia de NO <sub>2</sub> y O <sub>3</sub>	Carcinógeno
So <sub>x</sub>	Combustión de compuestos azufrados	Diversos, embolia pulmonar
O <sub>3</sub>	Formación en presencia de NO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> y radiación solar	Congestión pulmonar
Pb	Vehículos de gasolina	Daños al sistema nervioso, anemia
NH <sub>3</sub>	Agricultura, Ganadería, Pesca, y Fuentes Naturales	Daños vías respiratorias
Gases Invernadero	Combustión, Transporte, Tratamientos de residuos, Agricultura y Ganadería	Calentamiento atmosférico, desequilibrio climático

**Tabla 1.5. Fuentes y efectos tóxicos de los principales contaminantes atmosféricos. Fuente: Ingeniería Ambiental Ed. Mc Graw Hill 1999.**

Por otro lado, la mayor parte del azufre que se encuentra en los combustibles fósiles, está en forma de compuestos orgánicos, tales como mercaptanos, disulfuros, sulfuros y tiofenos. Por tanto, durante la combustión de los mismos, se produce la emisión de elevadas cantidades de productos sulfurados a la atmósfera, especialmente en las actividades industriales y en el transporte.

El azufre se emite directamente como óxidos de azufre, o indirectamente como ácido sulfhídrico procedente del refino del crudo o de la limpieza del gas natural antes de su distribución. Estos óxidos de azufre en la atmósfera, en contacto con vapor de agua, se convierten en ácido sulfúrico, regresando a la superficie dando lugar a lo que se conoce como “lluvia ácida”, comprendiendo este término también la niebla y la nieve ácida.

Los efectos negativos que provoca la lluvia ácida sobre el ser humano, incide directamente sobre su salud. En la cual, la presencia de neblinas, gases, aerosoles y partículas ácidas, han permitido detectar efectos adversos en poblaciones sensibles a las enfermedades respiratorias agudas, así como en personas con problemas cardíacos y circulatorios.

Los efectos sobre el medio ambiente, también son apreciables, provocando que los primeros recursos afectados sean las aguas superficiales, como ríos, lagos y estanques. De modo que si estos ecosistemas acuáticos se acidifican, producen un trastorno en la reproducción de los organismos superiores e incluso pueden provocar su muerte. En los ecosistemas forestales, aumenta la acumulación de altas cantidades de metales pesados, produciendo una reducción del crecimiento de las plantas y aumentando también la mortalidad.

Otro efecto negativo que también va a producir, es el deterioro de los materiales de construcción. Esto origina un costo para la sociedad, significando la pérdida del patrimonio cultural, como monumentos históricos y zonas arqueológicas.

Para llevar a cabo un control de estas emisiones, y minimizar los efectos negativos provocados por la combustión de los combustibles fósiles, se han implantado en todo el mundo regulaciones muy estrictas en cuanto al contenido de azufre. Las normativas medioambientales relativas a la protección de la contaminación atmosférica, (*Directiva 2003/17/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de marzo de 2003*, por la que se modifica la *Directiva 98/70/CE* relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo), imponen límites más restrictivos en cuanto a los contenidos de azufre en los niveles de emisión. La EPA (*Environmental Protection Agency*) ha propuesto la reducción del contenido de azufre del diesel desde 500 ppm a 15 ppm, para el año 2006.

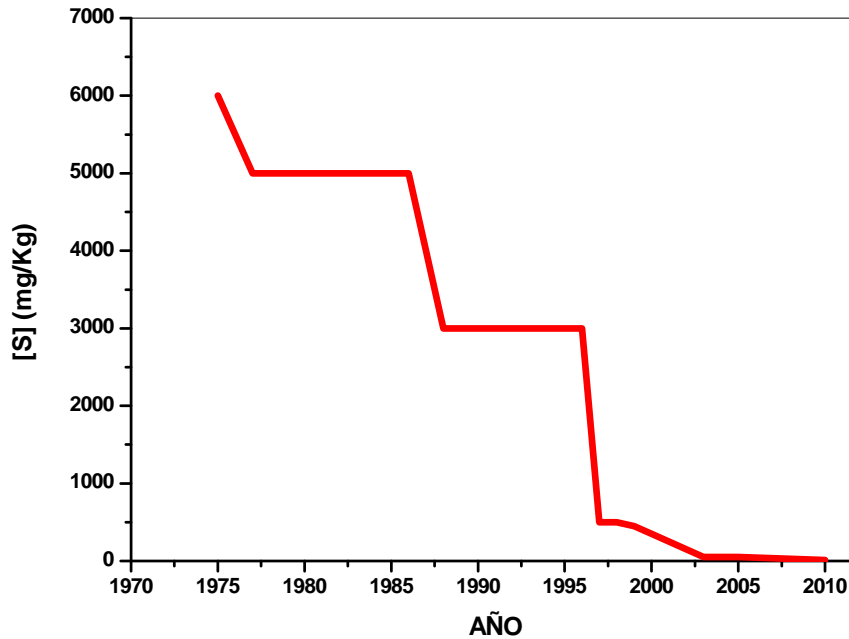
El límite de contenido de azufre en los carburantes para el transporte por carretera está establecido por la *Directiva 98/70/CE*, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 1998, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo.

Según esta normativa el combustible tipo diesel en el año 2005 debería haber sido del tipo ULSD, (*Ultra Low Sulfur Diesel*), con unos niveles de azufre de 50 ppm en diesel y gasolina, y teniendo que alcanzarse unos niveles mínimos en el año 2010, pasando a denominarse NZSD, (*Near Zero Sulfur Diesel*).



Año	1993	1996	2000	2005	2010
Diesel [S] ppm	2000	500	350	50	10
Gasolina [S] ppm	500	500	150	50	30

*Tabla 1.6. Evolución del contenido de azufre dentro del territorio europeo del diesel y gasolina.*



**Figura 1.5. Evolución de los niveles de azufre permitidos en gasóleo en Europa.**

Los vehículos a motor tienen una gran demanda de energía y terreno y son la base del sector transporte, el cual es uno de los que más aporta a la contaminación atmosférica. La economía y el bienestar social han hecho de ella su base, donde la producción y distribución de mercancías y servicios dependen del transporte.

Las principales fuentes de contaminación atmosférica causada por los vehículos a motor van a proceder en mayor medida de los gases de escape, así como de pérdidas debidas a la evaporación de combustible en el depósito y carburador. Por otro lado, se producen pérdidas en el cigüeñal, polvo de caucho de las ruedas, forro de los frenos y discos de embrague.

A pesar de que la contaminación del aire debida al uso de los vehículos a motor es inferior a la procedente de fábricas y viviendas, este foco de contaminación se tiene

que tener en cuenta debido al uso masivo de este tipo de vehículos. En las zonas urbanas, las emisiones de estos vehículos produce la acumulación de altas concentraciones de monóxido y dióxido de carbono, hidrocarburos y plomo, en el caso de vehículos que utilizan gasolina como combustible.

Los compuestos encontrados en las emisiones de los escape de vehículos diesel lo componen principalmente monóxido de carbono (CO), hidrocarburos (HC), así como acetaldehídos, benceno, formaldehído, metanol y fenol, debido principalmente a la combustión incompleta del diesel.

Por otro lado, los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) se generan por la reacción del oxígeno y del nitrógeno bajo condiciones de alta presión y temperatura en el interior de cilindro del motor y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Aparecen otros compuestos en concentraciones bajas pero que son muy nocivos, como derivado de cianuro, plomo inorgánico, compuestos de manganeso, compuestos de mercurio y arsénico.

El material particulado del diesel (MPD) o partículas, es un complejo agregado de materiales sólidos y líquidos. Su origen son partículas de carbono, generadas en el cilindro del motor durante la combustión. Las principales partículas de carbono de grandes moléculas, combinadas con otras, ambas orgánicas e inorgánicas, son componentes del escape del diesel. Generalmente, el MPD esta compuesto por:

- Sólidos, partículas de carbono seco, conocido como hollín.
- FOS, hidrocarburos pesados absorbidos y condensados en partículas de carbón, llamados fracción orgánica soluble.
- SO<sub>4</sub>, radical sulfato, ácido sulfúrico hidratado.

Compuesto	CO	HC	MPD	NO <sub>x</sub>	SO <sub>2</sub>
Nivel (ppm)	1-500	20-400	0.1-0.25	50-2500	10-50

**Tabla 1.7. Niveles de los componentes mayoritarios de las emisiones de escape de vehículos.**

Las emisiones de los motores diesel producen olores y contienen concentraciones relativamente altas de contaminantes, que producen inquietud sobre la opinión pública. La disminución de la contaminación debida a las emisiones de los vehículos depende principalmente de la reducción de contaminación de los vehículos desde el origen. Los métodos disponibles, sin tener en cuenta la instalación de convertidores catalíticos, incluyen el diseño de nuevos carburantes, así como el uso más eficiente de motores de encendido de mezcla pobre y el uso de vehículos eléctricos.

Debido a la exigencia de la normativa Europea, anteriormente mencionada, relativa a la calidad de los carburantes utilizados en automoción, ha provocado la necesidad de desarrollar tecnologías mediante las cuales se produzca un diesel con menor contenido en azufre.

Este nuevo tipo de gasóleo, que será denominado en toda la UE “Gasóleo sin azufre”, presenta las siguientes ventajas:

- disminución de la emisión de compuestos contaminantes.
- mejora de las prestaciones del motor, debido a que posee propiedades anticorrosión, antiespumantes y de desactivación de metales.
- incremento del número de cetano, indicador de la capacidad autocombustiva del combustible cuando es nebulizado y comprimido dentro de la cámara de combustión. De este modo se asegura una combustión más suave y limpia, generando una reducción de los humos blancos. Cuanto mayor es el índice de cetano, mayor es la calidad de combustión.

En Europa, la *Directiva 2001/81/CE* del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Octubre de 2001, sobre límites máximos de emisión de contaminantes atmosféricos, determinó que España debía lograr, para 2010, el máximo de 746 kilotoneladas de SO<sub>2</sub>, 847 kilotoneladas de NO<sub>x</sub>, 662 kilotoneladas de COV y 353 kilotoneladas de NH<sub>3</sub>.

#### **1.4. MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE AZUFRE**

Debido a las razones previamente comentadas (problemas ambientales y técnicos debido a la presencia del azufre) debe llevarse a cabo una desulfuración antes del uso de los combustibles fósiles.

El proceso de desulfuración se considera parte de los procesos de purificación en el refinado del crudo, cuyo objetivo es eliminar los compuestos sulfurados y de ese modo cumplir la normativa ambiental.

Los métodos de desulfuración se dividen en:

- Tratamientos de desulfuración reductiva o **Hidrodesulfuración (HDS)**.
- Tratamientos de desulfuración oxidativa, donde destacan los **Lavados Caústicos** y procesos de **Biodesulfuración (BDS)**.

##### **1.4.1. Hidrodesulfuración**

El hidrotratamiento se utiliza para eliminar alrededor del 90% de los contaminantes, como nitrógeno, azufre, metales e hidrocarburos insaturados (olefinas), de las fracciones de petróleo líquidas. En este proceso se utiliza el hidrógeno y un catalizador para enriquecer el contenido de hidrógeno de la carga de las olefinas. Normalmente se realiza antes de llevar a cabo otras transformaciones (como la reforma catalítica), para que el catalizador no se contamine con la carga de material no tratado.

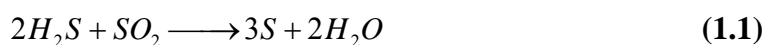
Los procesos de hidrotratamiento difieren en función de la carga y los catalizadores. La hidrodesulfuración es el proceso que elimina únicamente el azufre de las fracciones, reduciendo los compuestos aromáticos, así como las características que van a favorecer la formación de gomas, y satura cualquier tipo de olefinas. (Speight, 1981).

La hidrodesulfuración posee baja selectividad, siendo una gran ventaja debido a que el azufre presente en estas fracciones, aparece en estructuras químicas muy variadas, por otro lado es una tecnología conocida e implantada en las refinerías.

Otro proceso asociado a la hidrodesulfuración, es la hidroformación, el cual es un proceso de deshidrogenación que se utiliza para recuperar el exceso de hidrógeno y así producir combustible de alto índice de octano. Los productos hidrotratados se mezclan o se utilizan como material de carga para la reforma catalítica.

En la hidrodesulfuración catalítica, la carga se desairea, se mezcla con hidrógeno, se precalienta y se hace pasar a alta presión por un reactor catalítico de lecho fijo. La mayoría de reacciones con tratamiento con hidrógeno se llevan a cabo por debajo de los 425°C para minimizar el craqueo, así que la alimentación del reactor se calienta generalmente a temperaturas entre 260 y 425°C. Las presiones utilizadas habitualmente varían entre 5 y 10 MPa, dependiendo del rendimiento requerido. El hidrógeno se separa y recicla y el producto se estabiliza en una columna de destilación primaria donde se eliminan los residuos ligeros.

Los compuestos de azufre y nitrógeno se convierten en ácido sulfhídrico y amoníaco en el reactor de fase primaria por medio de un catalizador de óxidos metálicos, los más usados son CoMo, NiMo, Mo<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, aunque también se usan óxidos de W, Nb y Ti en base de alúmina o sílice, en función del proceso de HDS que se utilice (Oyama y col., 2003). El ácido sulfhídrico y el amoníaco residuales se eliminan por arrastre con vapor, mediante un separador combinado de alta y baja presión o bien por medio de un lavado con aminas que recupera el ácido sulfhídrico en una corriente altamente concentrada, apta para la conversión en azufre elemental, (Gary y Hankwerk, 1994), que posteriormente se separa a través del *método de Claus*.



En el hidrotratamiento debe controlarse el ácido sulfhídrico que contiene la carga para mantenerlo a un nivel mínimo con objeto de reducir la corrosión. En ocasiones puede formarse cloruro de hidrógeno y se condensa en forma de ácido clorhídrico en las secciones de baja temperatura de la unidad. En las unidades de alta presión y temperatura se forma bismuto amónico. En caso de fuga se produce exposición a vapores de naftas aromáticas que contienen benceno, a ácido sulfhídrico o hidrógeno gaseoso, o a amoníaco si se origina una fuga o derrame de agua amarga. También puede haber fenol si se procesan cargas con alto punto de ebullición.

El proceso de hidrodesulfuración se esquematiza en la Figura 1.6.

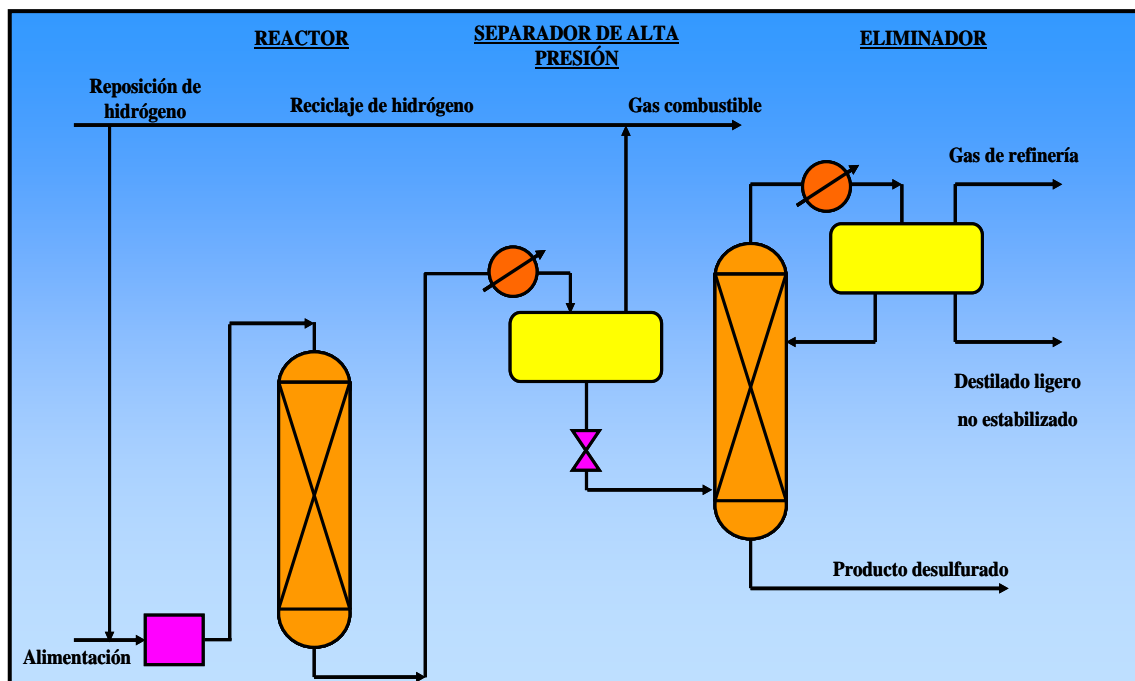


Figura 1.6. Esquema del proceso de hidrodesulfuración. Fuente: OSHA 1996.

En el caso de destilados de bajo y medio punto de ebullición, las condiciones típicas de reacción varían entre 300-400°C de temperatura y 0.7-5 MPa de presión de hidrógeno.

En general, cuanto mayor es el contenido de azufre, la temperatura de ebullición es mayor, y son necesarias unas condiciones de operación más severas para llevar a cabo la desulfuración, así como el uso de catalizadores más complejos. Estos requerimientos encarecen el coste final del proceso, por un lado, al exigirse mayores requerimientos energéticos en función del grado de complejidad y aromaticidad de los compuestos organosulfurados, y por otro, al aumentar la complejidad de los catalizadores, ya que estos van a ser más sensibles a envenenamiento, afectando a su actividad. Kabe y col., 2001, han reportado que la presión parcial de  $H_2S$  tiene un efecto inhibitor de la actividad y selectividad catalítica, en reacciones de desulfuración que demandan condiciones estrictas.

Sin embargo, a pesar que el proceso de hidrodesulfuración es capaz de eliminar compuestos orgánicos de azufre sencillos, no es efectiva la eliminación de moléculas poliaromáticas encontradas en las fracciones más pesadas, como son los pertenecientes

al grupo de dibenzotiofenos y naftotiofenos (Monticello, 1998; Brunet y col., 2005; Mohebbi, 2008).

El dibenzotiofeno y especialmente sus derivados alquilados, con sustituyentes en distintas posiciones de los anillos respecto del átomo de azufre, van a ser refractarios a los catalizadores convencionales utilizados en el proceso de hidrodesulfuración.

Por esa razón, es necesaria una mejora del proceso de hidrodesulfuración, en los últimos años se están investigando catalizadores con base de platino y paladio (Robinson y col., 1999), así como rutenio y rodio (Itsuhara y col., 2005) los cuales aumentan las actividades de hidrogenación de estos compuestos.

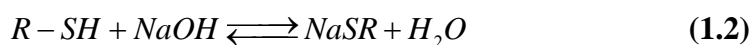
Por otro lado, también se hace necesaria utilizar una tecnología alternativa o complementaria, como pueden ser los procesos de desulfuración oxidativa, en presencia de  $H_2O_2$  y terc-butil hidroperóxido (TBHP) (Dumont y col, 2007), lavados cáusticos y el uso de procesos de biodesulfuración.

### ***1.4.2. Lavados cáusticos***

Los lavados cáusticos son procesos químicos utilizados para la eliminación de compuestos indeseables presentes en las fracciones petrolíferas. Estas impurezas, formadas por compuestos de azufre, nitrógeno u oxígeno, proporcionan unas propiedades asociadas indeseables.

Los tratamientos de extracción u oxidación de las fracciones petrolíferas, se realizan con el objeto de mejorar el olor y reducir la corrosividad aportada por los compuestos orgánicos sulfurados.

El proceso de extracción elimina los compuestos orgánicos azufrados por lavado cáustico conduciendo a un menor contenido de azufre. A baja temperatura se produce la siguiente reacción:



Otro proceso que es también utilizado es el *endulzamiento*. En este caso no hay una reducción del contenido total de azufre y en consecuencia, solo se aplica a corrientes donde no existen problemas con la especificación de los niveles de azufre. Este proceso implica una oxidación de los compuestos azufrados presentes en las fracciones, reduciendo su olor y haciéndolos menos corrosivos, pero sin embargo se forma disulfuro, el cual no es eliminado.



Los compuestos orgánicos azufrados son separados de las fracciones de hidrocarburos ligeros por un lavado con álcali concentrado en una columna de extracción bajo presión moderada a 6 bar. La corriente de hidrocarburos tratada y libre de olor es eliminada por la cabeza de la columna. La fase acuosa del fondo del reactor es calentada a 50°C, se mezcla con aire y se alimenta el reactor de oxidación. Posteriormente la sal sódica formada con el compuesto azufrado (NaSR) es disuelta y convertida a disulfuros, que van a ser insolubles en la sosa cáustica, a 5.5 bar. Introduciendo un exceso de aire y añadiendo un catalizador se mantiene una alta velocidad de reacción, de esta forma se regenera el reactivo alcalino.

En una etapa posterior, el líquido del reactor es dirigido a un depósito donde se separan el aire, la fracción de disulfuros insoluble en el álcali y la solución alcalina. El aire es dirigido hacia un horno de procesos para la combustión de los hidrocarburos, reutilizándose, y el cáustico regenerado se reenvía a la columna de extracción.

Otro proceso de oxidación de compuestos orgánicos azufrados, utiliza un lecho de catalizador sólido pero sin embargo la solución cáustica no puede ser regenerada. Se inyectan aire y una cantidad mínima de álcali, en la corriente de hidrocarburos, que al atravesar el lecho del catalizador, oxida los compuestos azufrados a disulfuros, que posteriormente son eliminados.

Ambos procesos están integrados en el llamado “sistema de cascada cáustica” para conseguir la calidad de producto deseada, pero con el mínimo consumo de álcali y coste de eliminación de reactivo gastado.



Los procesos de oxidación-extracción de compuestos azufrados implican su eliminación de fracciones de las corrientes ligeras, como nafta, GLP, gasolina, y en algunas ocasiones queroseno.

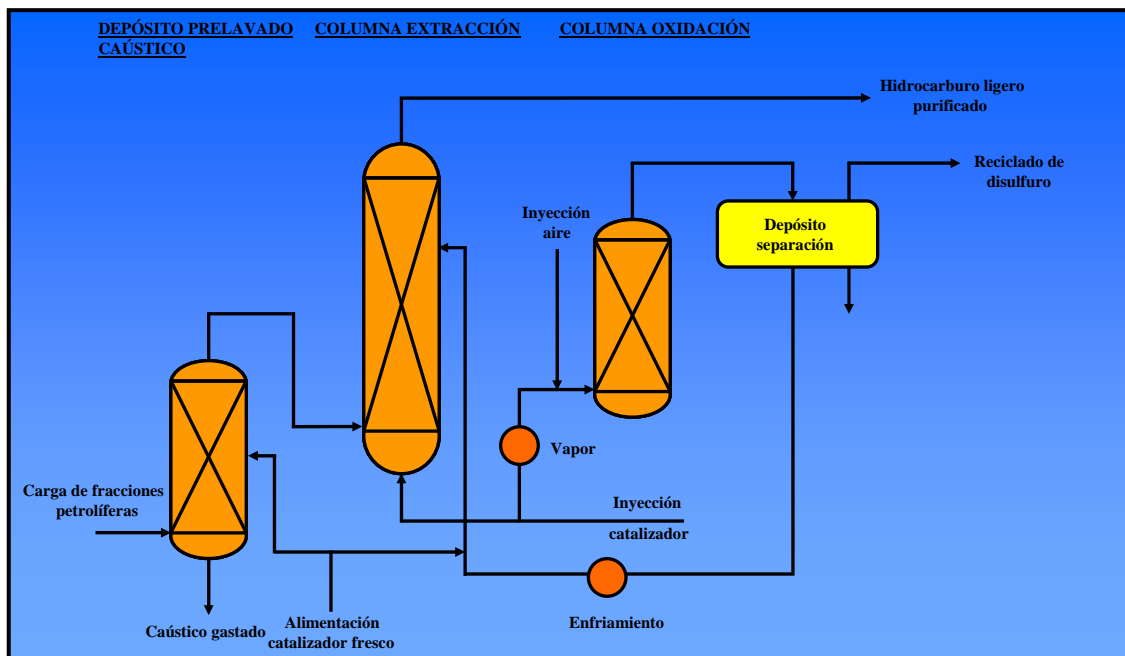


Figura 1.7. Esquema del proceso de lavados cáusticos de mercaptanos.

### **1.4.3. Biorreducción**

Los procesos de biorreducción (BDS) son aquellos en los que se emplean microorganismos como biocatalizadores para eliminar el azufre de los combustibles fósiles (Monticello y Finnerty, 1985). Con este proceso se puede obtener la máxima rentabilidad, utilizándolo de forma complementaria a un tratamiento previo de hidrodesulfuración, en el cual se alcanzarían unos niveles de azufre en torno a 50 ppm y con el posterior tratamiento de biorreducción podrían disminuirse a niveles inferiores a 10 ppm (Kilbane, 2006; Mohebbi y col., 2008) cumpliendo de este modo las exigencias de la normativa medioambiental.

El proceso de BDS de petróleo y fracciones petrolíferas, comenzó a utilizarse a mediados de los años 50 (ZoBell, 1963), pero sin demasiado éxito. Sin embargo, fue a finales de los años 70, cuando diversas organizaciones, en la que contaban la participación del Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE) comenzaron a promover trabajos en esta área, obteniéndose así importantes avances (Lee y col. 1995),

extendiéndose estos también a lo largo de los años 80, con la identificación de bacterias con la capacidad de liberar azufre procedente de las moléculas organosulfuradas de dibenzotiofeno (DBT), sin afectar a la cadena carbonada. Sin embargo los avances más importantes se desarrollaron a lo largo de la década de los años 90, en la cual se descubrieron las propiedades de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Esta bacteria posee la capacidad de metabolizar el azufre de forma selectiva, eliminándolo en forma de sulfato, y en el cual el DBT se transforma en 2- hidroxibifenilo (HBP) (Kilbane, 1992), de este modo el valor energético, así como las propiedades del combustible no se ve afectado.

Como moléculas modelo se utiliza habitualmente DBT y sus derivados en los estudios de BDS. Estos compuestos se han utilizado para el desarrollo de catalizadores convencionales para la HDS, además, se trata de compuestos representativos de las moléculas recalcitrantes en las fracciones de gasóleo del petróleo (Kilbane y Bielaza, 1990).

La biodesulfuración, además de no afectar a las propiedades del combustible, exceptuando la eliminación selectiva del azufre en el DBT y sus derivados, se trata de una tecnología que requiere un menor requerimiento energético que la HDS, debido a que son necesarias condiciones de presión y temperatura mucho más suaves. Por otro lado, la producción bacteriana es relativamente sencilla, por lo que va a implicar un abaratamiento del coste de operación y una disminución en la complejidad de las instalaciones.

Una de las principales desventajas de este proceso, es el alto grado de especificidad de las enzimas encargadas del metabolismo de los compuestos orgánicos azufrados. Asimismo, es necesario el uso de una fase acuosa, la cual es imprescindible para la supervivencia del biocatalizador. Sin embargo, esto va a implicar la existencia de problemas de transferencia de los compuestos orgánicos a degradar, así se hace necesaria una etapa de separación de fases al final del proceso.

Los procesos de BDS pueden clasificarse según el tipo de metabolismo lleven a cabo los microorganismos, diferenciando, metabolismo anaerobio (reductivo), aerobio (oxidativo) y aerobio facultativo (mixto), en función de la presencia o ausencia de

oxígeno, ya que este actúa como aceptor de electrones en el proceso (Mc Farland, 1999).

Otra clasificación que puede hacerse para este tipo de procesos, es en función del mecanismo de degradación de la molécula de DBT, en la cual se pueden diferenciar dos mecanismos:

- Degradación de DBT con ruptura de enlace C-C, donde se encuentran los mecanismos destructivos y semidestructivos.
- Degradación de DBT con ruptura de enlace C-S, donde se engloban los mecanismos no destructivos.

### ***1.4.3.1. Degradación de DBT con ruptura de enlace C-C***

#### ***-Biodesulfuración anaerobia.***

Algunas bacterias poseen la capacidad de eliminar azufre de compuestos orgánicos en ausencia de oxígeno (*desulfuración reductiva*), sin embargo los niveles de reducción de azufre no son importantes (Oshiro e Izumi, 1999).

La bacteria *Desulfovibrio desulfirans* M6, es capaz de degradar el 96% de benzotiofeno (BT) y el 42% de DBT, de modo que convierte el DBT y BT, en bifenilo y ácido sulfhídrico (Kim y col., 1990; Soleimani y col., 2007).

Algunos microorganismos anaerobios, como *Desulfomicrobium scambium* y *Desulfovibrio longreachii*, poseen una actividad de desulfuración de solo un 10% de DBT, apareciendo metabolitos que no han podido ser identificados. Este hecho indica que la ruta de degradación que sigue es distinta de la ruta habitual de este tipo de bacterias (Yamada y col., 2001).

La principal desventaja es que el mantenimiento de los procesos de biodesulfuración anaeróbica son extremadamente complejos, esto junto a que la actividad de la mayoría de cepas que ha sido reportada, tienen poca afinidad por las moléculas de DBT (Armstrong y col., 1995, Lizama y col., 1995), hacen que sea un proceso poco interesante.

### ***-Biodesulfuración aerobia.***

Los primeros estudios que se desarrollaron en procesos de biodesulfuración aerobia, destacaban la habilidad de las bacterias para consumir compuestos tiofénicos como fuente de energía (Labiorde y Gibson, 1997; Malik, 1980; Kirshenbaum, 1961).

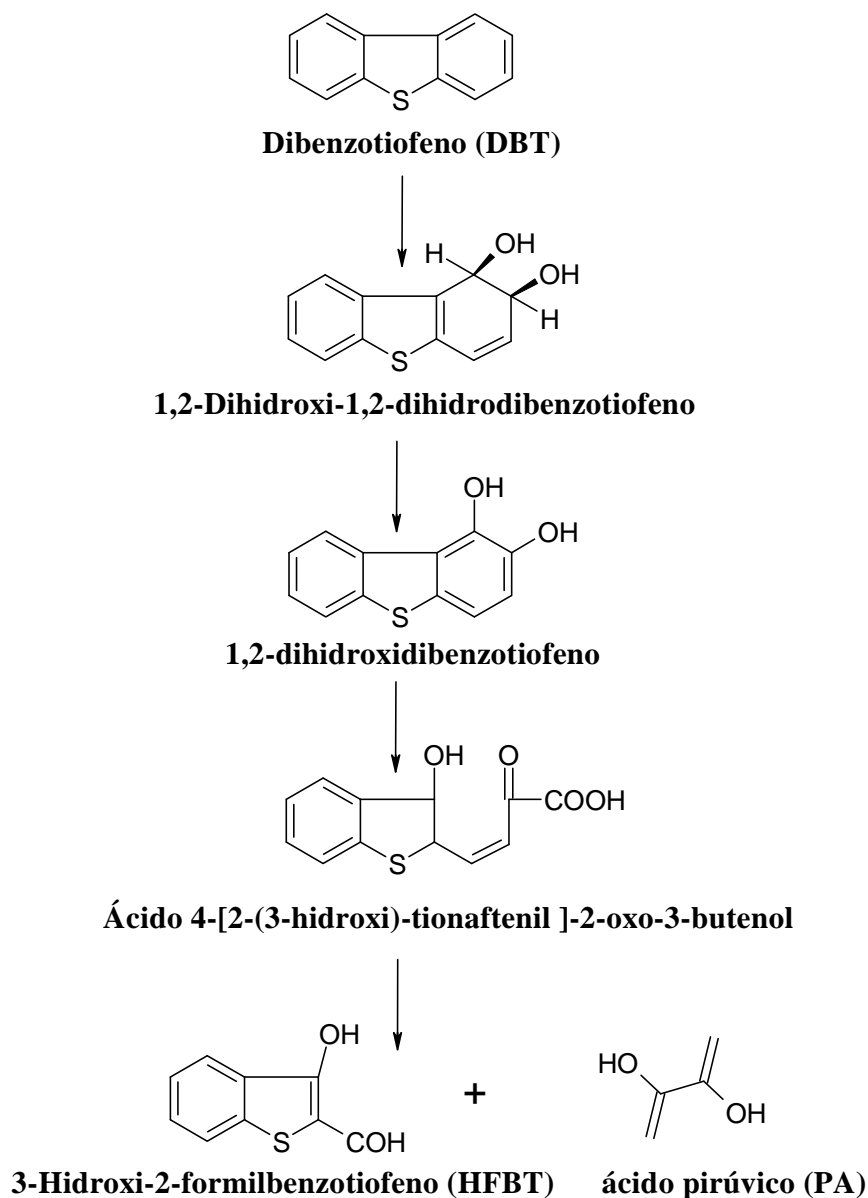
Algunas bacterias pueden utilizar DBT como fuente de carbono, a través de una ruta que implica una serie de etapas oxidativas (Kodama y col, 1970; Kodama, 1973; Yamada y col, 1968; Monticello y col, 1985). El fundamento de este proceso es la ruptura del enlace de uno de los anillos aromáticos, mientras que el azufre no resulta liberado de la molécula. Debido a la indeseable ruptura del enlace C-C en el anillo bencénico, este tipo de desulfuración está considerado como un proceso destructivo.

A esta ruta de destrucción oxidativa debida a la acción de un mecanismo enzimático que ataca a los átomos de carbono del anillo aromático se le conoce como ruta de Kodama (Mc Farland y col, 1998), el cual consta de tres etapas: hidroxilación, ruptura del anillo aromático e hidrólisis. El esquema de dicha ruta se muestra en la Figura 1.5.

En la primera etapa, se produce una hidroxilación de DBT, que posteriormente provoca la ruptura del anillo aromático, entre los sustituyentes hidroxilos. La eliminación de azufre nunca se llega a eliminar de forma inorgánica, por lo que se elimina en forma de otra molécula orgánica, HFBT. Por esta razón no se trataría del biocatalizador más adecuado. A este tipo de biocatalizadores se les considera como semidestructivos.

La mayoría de las investigaciones se han centrado en bacterias de la especie *Pseudomonas* (Hartdegen y col, 1984). En 1985, Monticello y col, mostraron que la ruta de Kodama para la degradación de DBT, estaba asociada a un plásmido que aparecía presente en al menos dos especies de *Pseudomonas*: *P. alcaligenes* y *P. putida*.

Otra posibilidad es la desarrollada por la bacteria *Brevibacterium* D.O. (Van Affeder y col., 1990), la cual durante el crecimiento, puede consumir DBT como fuente de carbono, azufre y energía.

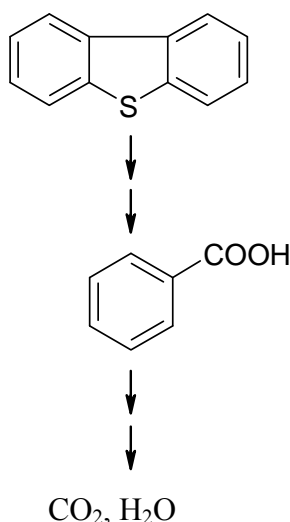


**Figura 1.8. Ruta enzimática de degradación de DBT, con ruptura de enlace conocida como ruta de Kodama.**

La ruta de degradación de DBT es distinta a la ruta de Kodama, y parcialmente similar a la ruta 4S. A través de esta ruta, el DBT es transformado en dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO), y posteriormente a dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>). En la última etapa de la ruta, el DBTO<sub>2</sub> es convertido en benzoato y finalmente mineralizado a agua y dióxido de carbono. Estos se consideran biocatalizadores destructivos.

Por otro lado, la bacteria *Anthrobacter* K3b (también llamada DBTS2), puede transformar DBTO<sub>2</sub>, pero no DBT, a sulfato y benzoato (Sato y Clark, 1995), haciendo uso de la misma ruta que *Brevibacaterium* D.O., en la cual la desulfuración lleva asociada una ruptura del anillo aromático (Nojiri y col, 2001; Dahlberg y col., 1993).

Además, el metabolismo de DBT se ha estudiado también en hongos. *Cunnighamella elegans* muestra la habilidad de metabolizar DBT a DBTO, y este finalmente a DBTO<sub>2</sub>, deteniéndose la ruta en este punto (Schlenk y col., 1994).



**Figura 1.9. Ruta de degradación de DBT, con ruptura de enlace C-C, típica de biocatalizadores destructivos.**

#### **1.4.3.2. Desulfuración de DBT con ruptura de enlace C-S.**

Actualmente se conocen una gran cantidad de microorganismos que son capaces de utilizar DBT únicamente como fuente de azufre. Esto va a producir la ruptura selectiva de los enlaces C-S de la molécula, sin modificar su esqueleto carbonado. Este tipo de mecanismo es denominado *biodesulfuración*, y no es considerado como un proceso de degradación de DBT.

La ruta metabólica específica para la desulfuración de DBT consta de cuatro pasos enzimáticos en serie, catalizados por las enzimas DszA, DszB, DszC y DszD, y obteniéndose como producto final libre de azufre 2-hidroxibifenilo (HBP) (Gallagher y col., 1993). En la Figura 1.7 se muestra este mecanismo enzimático, conocido como *ruta 4S*.

Se conocen una amplia variedad de microorganismos capaces de eliminar selectivamente DBT o sus derivados a través de esta ruta. A través del uso de técnicas de screening, Kilbane y col. (1990), aislaron la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (también conocida como *R. rhodochrous*) y *Bacillus sphaericus* IGTS9, siendo la primera la más estudiada por su capacidad desulfurante.

Sin embargo, existen otros microorganismos capaces de llevar a cabo la desulfuración oxidativa, como pueden ser *Agrobacterium* MC501 (Constanti y col., 1996), *Mycobacterium* G3 (Nekodzuka y col., 1997), *Gordona* CYKS1 (Gilbert y col., 1998), *Klebsiella* (Dudley y col., 1994), *Xanthomonas* (Constati y col., 1994), *Norcadia globelula* (Wang y col., 1994), y bacterias termófilas como *Paenibacillus* (Konishi y col., 1997). El uso tipo de bacterias termófilas es interesante, ya que mejora los rendimientos de desulfuración y la temperatura a la cual se desarrolla el proceso es próxima a las utilizada en los procesos de hidrodesulfuración.

### **- *Rhodococcus erythropolis* IGTS8**

Las bacterias del género *Rhodococcus erythropolis* se encuentran comúnmente en el suelo, son bacterias aerobias, mesófilas y Gram-positivas, obtenidas por screening de suelos contaminados por vertidos de hidrocarburos (Yan y col., 2000; Abbad-Andaloussi ,2003; Watkins y col., 2003; H. del Olmo y col., 2005). Son bacterias capaces de utilizar distintos compuestos como fuente de carbono y energía. Son capaces de eliminar el azufre presente en la molécula de DBT mediante una ruptura del enlace C-S, sin afectar a la estructura carbonada, evitando así la pérdida de poder energético del combustible desulfurado.

Se conocen varias cepas de este género las cuales son capacidad de desulfurar compuestos organosulfurados. Las más conocidas son las especies N1-43, D-1, KA2-5-1, I-19 y pero la más estudiada, es la especie IGTS8.

*R. erythropolis* IGTS8, es capaz de usar DBT como fuente de azufre, pero no como fuente de carbono (Kilbane y Jackowski, 1992), desulfurando los compuestos organosulfurados mediante la ruta 4S, esquematizada en la Figura 1.10.

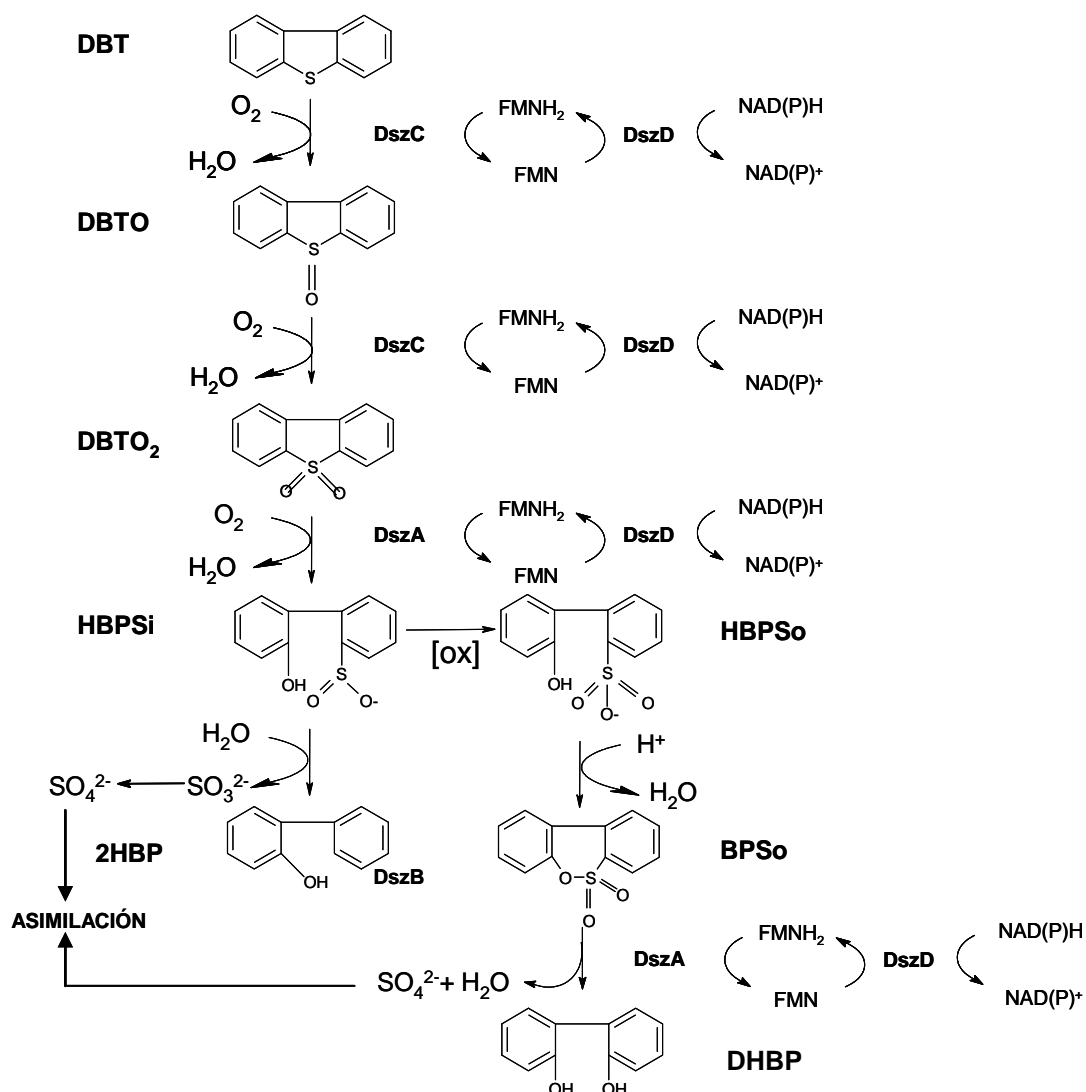


Figura 1.10. Ruta 4S específica de desulfuración de DBT de *Rhodococcus erythropolis* IGST8.

En *R. erythropolis* IGST8, el sistema *dsz* está constituido por los cuatro genes implicados en la desulfuración de DBT y sus derivados. Denome y col. (1993) aislaron el plásmido pSOX, el cual estaba constituido por los genes, *soxA*, *soxB*, *soxC*, organizados en un único operón que transcribe en la misma dirección, bajo el control de un único promotor (Oldfield y col., (1997)) y *soxD* (Denis-Larouse y col., 1995), también conocidos como *dszA*, *dszB*, *dszC* y *dszD*, que codifican las enzimas DszA, DszB, DszC y DszD respectivamente.

Posteriormente el ADN de *R. erythropolis* IGST8 fue secuenciado por los grupos de Denome y col. (1994) y Piddington y col. (1995) de forma simultánea.



Las enzimas implicadas en esta ruta, son la DszC y DszA, monooxigenasas, DszD, flavin reductasa y DszB, desulfinaasa.

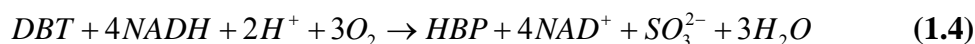
La enzima DszC, dibenzotiofeno monooxigenasa, de 45kDa, cataliza la primera etapa de la ruta, donde DBT pasa a formar dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO) y en una segunda etapa, lo transforma en dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>). Esta enzima posee propiedades excepcionales, debido a que primero, es capaz de catalizar dos reacciones consecutivas como flavomonooxigenasa. Por otra parte, utiliza FMNH<sub>2</sub> como cosustrato, mientras que las monooxigenasas clásicas catalizan una sola reacción y utilizan FAD para ello.

La enzima DszA, es una proteína de 49.5 kDa con 453 aminoácidos que cataliza la transformación de DBTO<sub>2</sub> a (2'-hidroxibifenil)-benceno sulfinato (HBPSi), utilizando FMNH<sub>2</sub> como cosustrato (Xi y col., 1997) en una reacción entre 5 y 10 veces más rápida que la etapa controlada por la enzima DszC (Gray y col., 1996).

Los átomos de oxígeno incorporados en cada paso de la ruta proceden de moléculas de oxígeno molecular (Oldfield y col., 1997). Por otra parte, la ruta 4S necesita un metabolismo celular para producir equivalentes de reducción en un proceso altamente energético, en el cual se requieren cuatro moléculas de NADH por mol de DBT desulfurado. Las enzimas DszC y DszA no utilizan NADH directamente, pero sí que utilizan FMNH<sub>2</sub> de la enzima flavin oxidoreductasa o DszD, de 20 kDa. Esta enzima asocia la oxidación de sustrato por la DszA y DszC con la oxidación de NADH en cada caso, mediante la reducción de FMH a FMNH<sub>2</sub>, a través de una cinética de saturación (Gray y col., 1996 y Oldfield y col., 1997).

En la última etapa de la ruta 4S la enzima DszB o HBPS desulfinaasa, la cual se determinó que era un monómero (Grey y col., 1996) de 39.0 kDa con 365 aminoácidos (Denome y col., 1994), rompe el enlace C-S entre el grupo fenilo y el grupo ácido sulfinico, formando sulfito o sulfato y 2-hidroxibifenilo (HBP) como producto final libre de azufre.

*R. erythropolis* IGST8 requiere de oxígeno y de NADH para llevar a cabo su actividad metabólica. Estequiométricamente, la ruta 4S, la cual terminaría en la producción de 2-HBP, puede resumirse en su totalidad con la siguiente reacción (Oldfield y col., 1995).



A pH neutro, el primer paso de la reacción, catalizada por la enzima DszC, puede expresarse del siguiente modo:



La función de la enzima DszC es la de convertir DBT en DBTO<sub>2</sub> la cual es NADH dependiente y utilizará como cosustrato FMNH<sub>2</sub>. En la cepa de *R. erythropolis* IGST8 la enzima FMN oxidoreductasa dependiente de NADH, también conocida como DszD, es la responsable de la generación de FMNH<sub>2</sub> utilizada en este paso.

La producción de DBTO<sub>2</sub> puede terminar en la formación de HBP, o bien tomar una ruta alternativa en la cual DBTO<sub>2</sub> se transforma en 2,2'-dihidroxibifenilo (DHBP), siendo ambas reacciones dependientes de oxígeno molecular y NADH.

Cuando la reacción está dirigida hacia la producción de HBP, su estequiometría puede expresarse del siguiente modo:

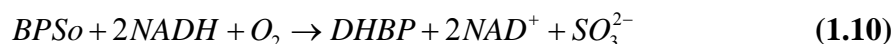
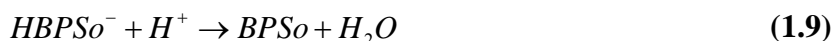


En esta etapa se produce la conversión de DBTO<sub>2</sub> a HBPSi, la cual es catalizada por la enzima DszA, que requiere FMNH<sub>2</sub> como cosustrato, aportado por la enzima DszD, dependiente de NADH. En la siguiente etapa se produce la conversión de HBPSi en HBP y sulfito, siendo esta etapa catalizada por la enzima desulfinasas DszB, la cual a diferencia de la etapa anterior no va a ser NADH dependiente.



La enzima DszA es capaz de catalizar la conversión de DBTO<sub>2</sub> a HBPSi, pero también de bifenilsulfonato (BPSO) a 2,2'-dihidroxibifenilo (DHBP) (Olson y col.,

1993 y Monticello y col., 1998), requiriendo ambas reacciones la presencia de NADH y oxígeno molecular.



La etapa de conversión de HBPSi a HBPSo no es totalmente conocida. En la Figura 1.10, se muestra la formación de 2'-hidroxibifenil-2-sulfonato (HBPSo), en la cual esta reacción se ve favorecida a pH 8.0 y 30°C. Posteriormente, BPSo es convertida a través de una reacción catalizada por la enzima DszA, dependiente de NADH, y utilizando como cosustrato FMNH<sub>2</sub> aportada por la enzima DszD, dando lugar a DHBP como producto final libre de azufre y sulfito.

El ión sulfito producido en la ruta 4S no puede ser metabolizado por *R. erythropolis* IGST8. Setti y col., (1994), mostraron que esta cepa no podía crecer en presencia de ión sulfito como fuente de azufre. Sin embargo, sí podía crecer en presencia de ión sulfato. Algunas investigaciones muestran que la sulfona es convertida directamente a HBPSo por oxidación directa y entonces es cuando pueden convertir HBP a DHBP bajo condiciones ácidas o básicas respectivamente (Omori y col., 1995).

*R. erythropolis* IGST8 sigue distintas rutas de desulfuración dependiendo de si se encuentra en condiciones de crecimiento o en parada de crecimiento (Gallagher y col., 1993 y Setti y col., 1999). Únicamente en condiciones de parada de crecimiento celular se llevará a cabo la desulfuración de DBT con la formación de HBP y sulfito o sulfato.

Según Oldfield y col, 1997, la ruta alternativa a la desulfuración de DBT a DHBP es cuantitativamente insignificante respecto de la desulfuración de DBT a HBP.

La regulación de los genes del sistema dsz está fuertemente reprimida por la disponibilidad de compuestos azufrados, como sulfato, metionina y cisteína (Oldfield y

col., 1997 y Kaufmann y col., 1998). En *R. erythropolis* IGST8, estos compuestos de azufre van a reprimir el promotor de la secuencia de genes *dsz*, o bien la síntesis de las enzimas en la etapa de transcripción, sin embargo, no inhiben a estas enzimas (Liz y col., 1996), por lo tanto, la acumulación de 2-HBP inhibe el crecimiento y la desulfuración (Nerodzuka y col., 1997).

Sin embargo, el crecimiento del biocatalizador *R. erythropolis* es lento, su estabilidad es inadecuada y su selectividad está demasiado restringida para su uso a nivel comercial. Por estas razones se llevaron a cabo estudios para aislar, caracterizar y manipular los genes implicados en la desulfuración, los cuales proporcionarían una amplia cobertura de microorganismos recombinantes basados en el genoma de *R. erythropolis* IGTS8.

La evolución directa y la manipulación de estos genes permiten aumentar los rendimientos de desulfuración y el rango de sustratos de compuestos de azufre, susceptibles de ser metabolizados.

Algunos biocatalizadores actuales carecen de las enzimas DszB o DszA, o incluso de ambas simultáneamente, de modo que ruta metabólica se detenga en la formación de sulfinato y sulfonato, o bien en sulfona, de modo que se puedan aprovechar estos productos con un interés comercial.

La eliminación de los promotores y el uso de estrategia de sustitución permiten aliviar la represión por la presencia de compuestos de azufre, de modo que permite la obtención de mayores rendimientos de desulfuración. En la década de los 90, la optimización de la producción de biocatalizadores recombinantes, permitió aumentar 200 veces su capacidad de desulfuración.

Para obtener esta mejora, se aumentaron las concentraciones de enzima DszA, DszB y DszC, así mismo se llevó a cabo una optimización de los requerimientos de la enzima DszD, y se consiguió eliminar las limitaciones que poseía la enzima

desulfinaasa DszB. Debido a todas estas mejoras realizadas, se consiguió que este tipo de biocatalizadores resultara comercialmente atractivo (Pacheco y col., 1999).

### **- *Pseudomonas putida* CECT5279**

Los biocatalizadores deben actuar óptimamente con altas concentraciones de hidrocarburos para ajustarse a los procesos petroquímicos y tener por tanto una elevada tolerancia a los disolventes. Según es conocido, la tolerancia de *Rhodococcus* se encuentra entre las más bajas, mientras que el género *Pseudomonas* se encuentra entre las bacterias con mayor tolerancia a disolventes, y los rendimientos de desulfuración obtenidos para DBT se incrementan introduciendo el cassette de genes dsz por manipulación genética (Gallardo y col., 1998).

Por otra parte, las bacterias con mayor capacidad degradativa pertenecen al género *Pseudomonas*, las cuales son capaces de degradar compuestos xenobióticos o sintéticos y aromáticos, como pueden ser pesticidas, herbicidas, refrigerantes y otros productos orgánicos.

De ahí que el uso de estas bacterias sea tan extendido para procesos de bioremediación y biodegradación, siendo ambos empleados tanto en plantas de tratamiento o in situ, pudiendo llegar a ser una solución efectiva y económica para la eliminación de residuos.

Por estas razones, a las bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas* como una candidato ideal para desarrollar procesos de desulfuración de fracciones petrolíferas.

Sin embargo, el empleo de este tipo de microorganismos con capacidad degradativa no esta exenta de limitaciones, tales como la cinética del proceso, que suele ser lenta, la biodisponibilidad del sustrato, que suele ser unos de los mayores inconvenientes (Kaufmann y col., 1998), así como la presencia de compuestos tóxicos que puedan limitar o inhibir la actividad y el crecimiento de la bacteria en esas condiciones.

El género *Pseudomonas* es el más importante del orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*. El género *Pseudomonas* consta de bacilos Gram negativos (Luo y col., 2003; Guobin y col., 2006), de diversas formas, curvados o rectos, de tamaño variable de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  por 1.5 a 5.0  $\mu\text{m}$ .

La bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 (Gallardo y col., 1997) ha sido el microorganismo utilizado en este trabajo de investigación. Se trata de un microorganismo modificado genéticamente al cual se le ha introducido el operón *dszABC* de *R. erythropolis* IGTS8 en el plásmido pSOEX3, utilizando una técnica de complementación por transferencia de cassettes metabólica.

Introduciendo estas modificaciones genéticas en la bacteria, se le ha aportado la capacidad de expresar los genes implicados en la ruta 4S, y de ese modo desulfurar el DBT y sus derivados.

La ruta empleada por esta bacteria para eliminar el azufre de la molécula de DBT es la ruta 4S, similar a la propuesta en el apartado anterior para *R. erythropolis* IGTS8 (Figura 1.8). Del mismo modo, los genes *dszA*, *dszB*, y *dszC*, que constituyen el operon *dszABC*, van a codificar para las enzimas DszA, DszB y DszC, respectivamente.

A diferencia de *R. erythropolis* IGTS8, va a poseer un gen que le confiere resistencia a la tetraciclina siendo, por tanto, necesaria la incorporación de este antibiótico en todos los medios de cultivo con el fin de evitar la pérdida del plásmido y consecuentemente de los genes que confieren la capacidad de desulfuración.

Por otro lado, se le ha introducido el gen *HpaC* de *Escherichia Coli* W (Galan y col., 2000 y 2001) integrado en el cromosoma bacteriano, el cual codifica para la enzima flavin NADH reductasa.

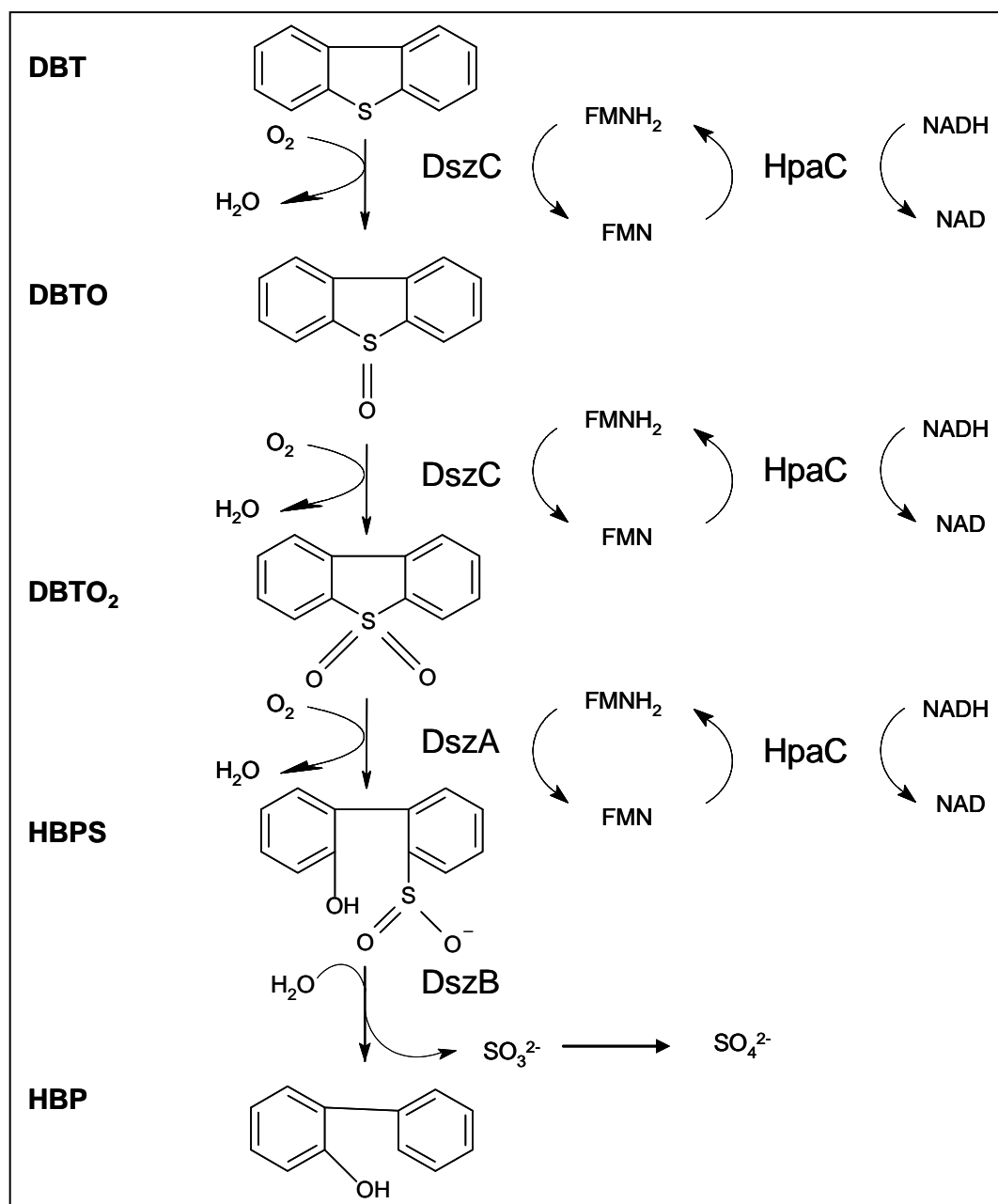


Figura 1.11. Ruta 4S específica de desulfuración de DBT de *Pseudomonas putida* CECT5279

La ventaja que presenta *P. putida* CECT5279 frente a *R. erythropolis* IGTS8 es que aumenta la eficacia del proceso, debido a que la expresión de los genes está controlada por un promotor más fuerte que el original, lo que permite mejorar la producción de las enzimas. Por otra parte, se eliminan las limitaciones existentes por la regulación por la presencia de fuente de azufre, la cual se consigue con el empleo de un promotor, capaz de expresar los genes implicados en la ruta 4S con independencia de que exista o no azufre en el medio de cultivo.

## **1.5. PROCESOS DE BIODESULFURACIÓN**

### **1.5.1. Biocatalizadores**

Al llevar a cabo el diseño de un proceso de biodesulfuración se han de tener en cuenta una serie de aspectos, tales como la naturaleza del biocatalizador, la forma de operación, que estará condicionada por el tipo de fracción y volumen de producto que se va a tratar, así como de los costes económicos del proceso.

Los procesos de biodesulfuración son controlados por biocatalizadores, los cuales se caracterizan por su elevada especificidad y selectividad sobre los distintos sustratos, así como la posibilidad de trabajar en condiciones suaves de presión y temperatura, sin embargo, se van a encontrar limitados en presencia de mezclas complejas, por lo que va a ser necesario mantener un ambiente adecuado para que puedan funcionar óptimamente.

Los biocatalizadores pueden referirse tanto a enzimas aisladas o extractos celulares como a células enteras, en la cual se mantiene intacta su estructura. También se pueden clasificar en función de la disposición en el reactor, diferenciándose *biocatalizadores libres*, los cuales se van a encontrar mezclados con el sustrato formando una suspensión homogénea, o bien *biocatalizadores inmovilizados*, los cuales se van a encontrar fijados a la superficie de un soporte insoluble.

El principal objetivo de la investigación de los procesos de biodesulfuración, es el desarrollo de un proceso comercial para tratar el petróleo, por lo que se ha estimado que la actividad del biocatalizador necesaria para este proceso tenga éxito comercial, debe encontrarse entre 1.2 y 3 mM DBT/ g CS/h (Monticello, 2000; Okada y col., 2003).

La actividad de las bacterias de origen natural habitualmente utilizadas en procesos de biodesulfuración, es insuficiente para satisfacer los requerimientos necesarios para conseguir un proceso que pueda ser comercialmente viable. Por tanto, el uso de la manipulación genética se ha convertido en una herramienta muy útil a partir de la cual se han obtenido mayores rendimientos de desulfuración.



En la Tabla 1.8 se recogen las actividades específicas de desulfuración en varios sistemas de BDS, comparando las actividades de cepas naturales y modificadas genéticamente.

Microorganismo	R <sub>BDS</sub> <sup>1</sup>	Referencia
<i>Paenibacillus</i> sp. A11-2 <sup>2</sup>	25% de DBT convertido a HBP	Konishi y col., 1997 y 2000; Ishii y col., 2000.
<i>Rhodococcus</i> cepa T09	Convierte DBT cuando es modificado genéticamente	Matsui y col., 2000 y 2001
<i>R. rhodochrous</i> IGTS8	1.18gDBT eliminado/gbiocatalizador·h.	Setti y col., 1999
<i>R. cepa</i> WU-K2R	57% de BT convertido	Kirimura y col., 2002
<i>R. cepa</i> ECRD-1	6ppm de S eliminado de diesel, 10% v/v	Grossman y col., 1999, 2001; Lee y col., 1995
<i>Nocardia</i> cepa CYSK2	0.28mgS/L·h, 10% v/v <sup>3</sup>	Chang y col., 1998
<i>Gordona</i> sp. cepa 213E	Desulfura BT	Gilbert y col., 1998
<i>R. erythropolis</i> N1-36	1.8μM de HBP·h <sup>-1</sup>	Wang y col., 1996A y B
<i>Corynebacterium</i> SY1	5μM de DBT·h <sup>-1</sup>	Omori y col., 1992

**Tabla 1.8. Rendimientos de BDS de distintas cepas en sistemas de células en crecimiento**  
(<sup>1</sup> rendimiento de BDS; <sup>2</sup> termófilo; <sup>3</sup> fracción de fase orgánica).

La cepa *Rhodococcus erythropolis* KA-2-5-1, presenta una de las mayores actividades en su cepa modificada genéticamente, en la cual se han introducido múltiples copias de los genes *dsz*, los cuales se han controlado bajo un promotor alternativo respecto de la cepa natural. De ese modo, se ha conseguido incrementar la actividad de manera sustancial de 50 a 250 μmol/g CS/h (Kobayashi y col., 2000; Konishi y col., 2005; Hirasawa y col., 2001).

Por otra parte, *Mycobacterium* sp. G3, es otra de las cepas que presenta una actividad notable, pero sin embargo, no presenta una aumento sustancial al ser modificada, la cual varía de 178 a 211 μmol/g CS/h (Takada y col., 2005). El estudio de desulfuración de esta cepa fue relevante, puesto que incluso después de la expresión de los genes *dsz* fue sometido a un control por un promotor fuerte (*Phsp60*), el cual no era conocido que estuviera regulado por la presencia de azufre, pero que podía ser reprimido en presencia de sulfato.

### **1.5.2. Formas de operación**

Los procesos de BDS en condiciones aerobias pueden llevarse a cabo de tres formas de operación: sistemas con células en crecimiento, sistemas libres de células y sistemas en células en reposo.

#### **- Sistemas de células en crecimiento**

En este sistema, el microorganismo utiliza como única fuente de azufre el compuesto que es susceptible de ser desulfurado. De modo que la velocidad de crecimiento de las células dependerá de su capacidad de extracción del azufre del DBT permaneciendo las enzimas desulfurantes con una actividad constante y el crecimiento es llevado a cabo en tanque agitado (Gallagher y col., 1993; Wang y col., 1994 y 1996; Setti y col., 1995, 1996, y 1999; Omori y col., 1992; Konishi y col., 1997 y 2005; Honda y col., 1998; Rhee y col., 1998; Kishimoto y col., 2000; Yan y col., 2000; Grossman y col., 2001; Schilling y col., 2002; Guchhait y col., 2005A y B; Chen y col., 2007; Caro y col., 2008).

El proceso se puede realizar tanto en fase acuosa, en el cual el DBT se encuentra en suspensión o bien en un medio bifásico, mezcla de agua/petróleo, en las que el DBT se va a encontrar disuelto en la fase orgánica. En algunos trabajos se ha empleado un disolvente modelo como el dodecano como disolvente orgánico.

Caro y col., 2008, estudiaron la influencia de la proporción de fase orgánica sobre *P.putida* CECT5279, utilizando hexadecano como disolvente modelo y DBT y  $MgSO_4$  como fuente de azufre. Observaron que la presencia de hexadecano en una proporción entre 0 y 50 % v/v no afecta significativamente al crecimiento utilizando  $MgSO_4$ . Sin embargo, si que se observó un efecto negativo al utilizar DBT, disminuyendo la producción de biomasa y el rendimiento de desulfuración. Este hecho es debido a la existencia de limitaciones en la transferencia de DBT de la fase acuosa a la fase orgánica.

Por otro lado, se conocen estudios en crecimiento en reactores tipo *air-lift*, como los desarrollados por Sánchez y col. (2008), utilizando distintas especies de

*Pseudomonas* N° 02, 05 y 06, con queroseno, en una proporción 1:1, obteniéndose un rendimiento máximo de desulfuración de 64%.

### ***- Sistemas libres de células***

Los experimentos de BDS realizados utilizando sistemas libres de células han sido muy reducidos, pero han conseguido demostrar que es posible llevar a cabo la desulfuración de DBT utilizando extractos celulares (Oshiro y col., 1994; Konishi y col.2000). Dada la complejidad que implica este proceso, ya que se trata de una reacción metabólica compuesta por varias etapas, parece inviable desarrollarlo a escala industrial, siendo una opción más adecuada el uso de células enteras (Le Borgne y Quintero, 2003).

El uso de sistema libres de células presentan la ventaja de requerir cantidades mínimas de agua o aún funcionar en sistemas anhidros, como las que se encuentran en fases orgánicas, por esta razón presentan mínimos problemas de transferencia de materia. Los problemas más importantes surgen en tratar de mantener las enzimas activas, debido a que las enzimas oxigenasas son muy sensibles y se desactivan rápidamente, sobre todo en contacto de disolventes orgánicos, así como los constantes requerimientos de FMN y NADH.

### ***-Sistemas con células en reposo***

Los sistemas de células en reposo o *resting cell* son los más estudiados (Gallagher y col., 1993; Izumi y col., 1994; Ohshiro y col., 1996, 1997, 1999; Konishi y col., 1997; Oldfield y col., 1997; Maghsoudi y col., 2000 y 2001; Castorema y col., 2002; Abbad- Andaloussi y col., 2003; Yang y Marison, 2005; Konishi y col., 2005A y B; Jia y col., 2006; Rashtchi y col., 2006; Alcon y col., 2008, Shavandi y col., 2009).

Las células son crecidas en un medio de cultivo en el cual se va a inducir la síntesis de las enzimas de la ruta de desulfuración. El crecimiento se detiene en un punto concreto, y se separan del medio de cultivo por centrifugación. Las células van a mantener intactos los sistemas enzimáticos, ya que se encuentran protegidos por la envoltura celular que actúa como barrera, evitando su degradación por contacto con el ambiente extracelular. La membrana posee permeabilidad, de modo que permite el

transporte en ambas direcciones (interior y exterior celular) de sustancias como el DBT así como otros compuestos de azufre y de los productos generados durante el proceso de desulfuración. Una vez crecidas las células, estas se conservan, permaneciendo en un estado de latencia, que pueden ser reactivadas si se les aportan los nutrientes adecuados.

El sistema ideal en el cual debe desarrollarse la reacción de BDS debe contener dos fases inmiscibles, consistentes en una fase acuosa, para mantener la viabilidad del microorganismo y su actividad, y una fase orgánica, donde se va a encontrar disuelto el compuesto organosulfurado. La mayor parte de los experimentos realizados han utilizado disolventes orgánicos modelos como dodecano, tetradecano y hexadecano, ya que aparecen de forma mayoritaria en la fracción diesel del crudo.

La mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo en condiciones acuosas o con fracciones orgánicas no superiores al 25%. Esto es debido a que la solubilidad de DBT en agua es del orden de 0.005 mM, y por lo tanto la biodisponibilidad de este compuesto por parte del microorganismo es baja. Luo y col., 2003, han reportado que la conversión de DBT depende de manera directa de la fracción orgánica utilizada en el ensayo. La biodisponibilidad de estos compuestos orgánicos e hidrófobos, es un parámetro físico-químico crítico en el rendimiento de degradación obtenido (Churchill y col., 1996).

Según lo reportado por Caro y col., 2007, en ensayos realizados en *resting cell*, la bacteria *P.putida* CECT5279 no posee capacidad desulfurante cuando la proporción de fracción orgánica es superior al 50% v/v. Este efecto puede explicarse porque esta bacteria no puede tomar el DBT directamente del medio orgánico, por lo que prácticamente no posee biodisponibilidad de DBT en el medio acuoso. Los mejores rendimientos alcanzados se obtienen en una relación de fase orgánica de 10% v/v. En cambio, en la bacteria *R. erythropolis* IGTS8 se observa una disminución de la capacidad desulfurante utilizando proporciones superiores al 50% v/v de fase orgánica, pero a partir de 75% v/v de fase orgánica no se observa conversión. Esta situación puede explicarse por la capacidad de esta bacteria de adherirse fuertemente a los solventes orgánicos, teniendo una mayor superficie interfacial de la emulsión y biodisponibilidad de los compuestos en ellos disueltos, que en el caso de *P.putida*

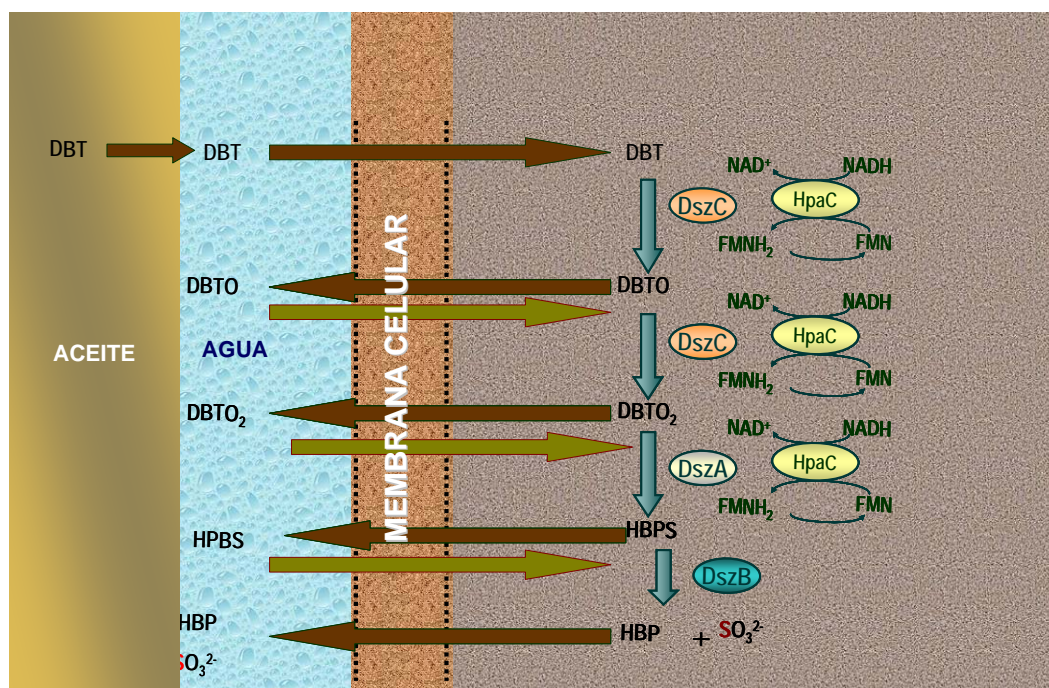
CECT5279. Con ambas bacterias, a altas proporciones de fase orgánica pueden producirse efectos tóxicos sobre la actividad de desulfuración.

Por otra parte, también se llevado a cabo estudios de los efectos de inhibición en el proceso de biodesulfuración en resting cell utilizando un medio acuoso. En el caso de *P. putida* CECT5279 se ha observado que no se produce una disminución del rendimiento de desulfuración al aumentar la concentración de HBP. En cambio, para *R. erythropolis* IGTS8, se produce una disminución del rendimiento de desulfuración, el cual se encuentra fuertemente afectado por la presencia de HBP en fase acuosa, aunque no así en medio bifásico, afectando solo a concentraciones elevadas, debido a la alta solubilidad de HBP en el disolvente orgánico (Caro y col., 2008).

Por otro lado, la reacción de oxidación se realiza en el citoplasma celular, por lo que se requiere el transporte de DBT de la fase orgánica a la célula. Las limitaciones de transferencia de materia, debida a la alta hidrofobicidad de DBT, van a ser el mayor problema que se va a aparecer en un proceso de BDS en un medio bifásico (Marcelis y col., 2003; Caro y col., 2007).

Este proceso de transporte queda descrito como una secuencia de etapas (Monticello y col., 2000), en la cual en la primera de ellas, el DBT presente en la fase orgánica, se transfiere a la fase acuosa, donde se introduce en el interior celular, y se pone en contacto con las enzimas implicadas en la ruta 4S, convirtiéndose en HBP. Posteriormente, esta molécula sale del interior celular y se transfiere a la fase orgánica.

La influencia de la capacidad de desulfuración también se va a ver afectada por la edad celular del microorganismo (Alcon y col., 2008), debido a que varía la actividad de las enzimas implicadas en la ruta 4S, obteniéndose, en el caso de *P. putida* CECT5279, una mayor actividad a tiempos cortos de crecimiento y donde la concentración de los equivalentes reducidos de la enzima HpaC no es una limitación en el citoplasma, por lo que no se han encontrado diferencias entre los ensayos realizados con células completas y con sistemas libres de células, (Alcón y col., 2005).



**Figura 1.12.** Esquema del transporte del compuesto azufrado al interior celular y de las reacciones de la ruta 4S.

La mayor parte de los trabajos realizados se han desarrollado a escala de erlenmeyer, aunque también se han realizado en distintos tipos de biorreactores, tales como tanques agitados.

Jia y col., 2006, estudiaron el efecto de la variación de la concentración de *Gordonia* sp. WQ-01 en *resting cell* en tanque agitado de 7.5L, utilizando como fase acuosa un tampón fosfato 0.1M y un 20% v/v de N-dodecano como fase orgánica. En todos los casos se obtuvieron rendimientos similares de desulfuración pero siendo necesarios tiempos inferiores al aumentar la concentración. Por otro lado, realizaron el estudio del efecto de la variación de la concentración inicial de DBT disuelto, con una concentración de biomasa determinada, observándose que era necesario un mayor tiempo de reacción para las concentraciones más elevadas de DBT, para obtener el mismo rendimiento final de desulfuración.

A escala industrial, utilizando un reactor tipo tanque agitado, solo la empresa *Energy Biosystems Corporation* (ECB), posteriormente llamada *Enchira Biotechnology Corporation* (ENBC) se ha dedicado al desarrollo de la tecnología de

biodesulfuración. El objetivo de esta empresa era la de tratar el diesel obtenido de la refinería, sometido a un tratamiento previo de HDS, por un proceso de biodesulfuración. A finales de la década los 90, se abrieron dos plantas piloto de biodesulfuración para diesel, con el suministro de diesel de *Total Raffinage Distribution S.A.* y *PetroStar* respectivamente.

ENBC demostró que el proceso industrial de biodesulfuración requería menos energía y generaba una cantidad de emisiones de CO<sub>2</sub> del orden de 20 a 27% menor comparado con el proceso convencional de HDS.

Posteriormente, *PetroStar* continuo con el desarrollo del proceso de biodesulfuración, en colaboración de Diversa, los cuales invirtieron en el aislamiento, caracterización y manipulación de los genes implicados en la ruta 4S, basados en el genoma de *Rhodococcus erythropolis*. Posteriormente, gracias a las técnicas de manipulación genética, se ha conseguido obtener microorganismos con una mayor capacidad de desulfuración, optimizando los requerimientos del sistema dsz y eliminado la limitación producida por la enzima desulfinaasa DszB, por otro lado, se ha conseguido que un mayor número de compuestos azufrados sean susceptibles de ser eliminados por este proceso

También se han hecho estudios en reactores de inmovilización de células enteras en soportes sólidos (Pacheco y col., 1999; McFarland y col., 1998; Setti y col., 1997).

El proceso se desarrolla en continuo, de ese modo se controlan mejor los problemas relacionados con el aumento de biomasa, y aunque es necesario añadir nutrientes para que las células crezcan. La cantidad de biomasa producida es inferior que en sistemas en continuo con células libres, y el crecimiento se encuentra más definido que si se trata de células en suspensión.

Otros autores, Li y col. (2005), han llevado a cabo estudios de desulfuración de gasolina utilizando la bacteria *Mycobacterium ggodii* X7B soportada en alginato de

sodio, con un 10% v/v de fase orgánica, durante 24 horas a 40°C, obteniendo un 69% de rendimiento de eliminación de azufre.

Otros reactores también han sido utilizados en menor medida como los de lecho fluidizado (McFarland y col., 1998), reactores de contacto en fase emulsionada (Kaufman y col., 1997; Pacheco y col., 1999), así como reactores de interfase (Oda y Ohta, 2002).

## **1.6. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO**

El objeto del presente trabajo es el estudio de la biodesulfuración de dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados alquilados (4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT) empleando el microorganismo genéticamente modificado *Pseudomonas putida* CECT5279, como biocatalizador. Estos compuestos han sido elegidos como compuestos modelo representativos de los compuestos azufrados que no son eliminados tras el proceso de hidrodesulfuración del diesel. El estudio se realizará en medio acuoso y en medio bifásico, y en el cual se utilizarán dos escalas de trabajo: agitador orbital y tanque agitado de 2L. La forma de operación elegida es conocida como *resting cell*, en el cual se utilizan células vivas en las que se ha detenido su crecimiento en un punto determinado. El proceso, por tanto, estará comprendido por dos etapas: la etapa de crecimiento, en la cual se obtiene el biocatalizador con capacidad desulfurante y el proceso de desulfuración.

Para ello, ha sido necesario desarrollar diversos estudios, por lo que el presente trabajo se ha dividido en tres bloques fundamentales:

El primer bloque se centra en la producción del biocatalizador. En primer lugar se llevará a cabo un estudio del crecimiento del biocatalizador en dos configuraciones de biorreactores distintas (tanque agitado y *air-lift*), en los cuales se realizará el correspondiente estudio cinético de crecimiento del microorganismo, así como un estudio de la capacidad desulfurante a distintas edades de crecimiento, para de ese



modo determinar las mejores condiciones de producción del biocatalizador en cada uno de ellos, y posteriormente realizar la desulfuración de DBT y de Cx-DBT.

Por otro lado, con el objetivo de producir una cantidad de biomasa suficiente para realizar los ensayos de biodesulfuración en *resting cell* a escala de tanque agitado, ha sido necesario realizar el escalado del proceso de crecimiento, utilizando biorreactores de mayor volumen, de forma que no se altere la capacidad desulfurante del microorganismo. Previamente, ha sido necesario realizar un estudio de las condiciones hidrodinámicas del biorreactor, y así determinar las condiciones de operación óptimas relacionadas con la velocidad de agitación y aireación.

En el segundo bloque se abordará el estudio cinético de la biodesulfuración de DBT y de los compuestos Cx-DBT en condiciones acuosas y bifásicas en condiciones de *resting cell*, utilizando agitador orbital y tanque agitado como escalas de trabajo. En el caso de DBT, se realizará el estudio cinético de todos los intermedios de la ruta 4S formados en las diferentes etapas del proceso de biodesulfuración. En cambio, el estudio cinético para los compuestos Cx-DBT se limitará tan sólo a los derivados alquilados y no a los intermedios de la ruta 4S correspondientes, debido a que no es posible cuantificarlos.

Una vez realizado el correspondiente estudio cinético de DBT y de Cx-DBT de forma individual, en las distintas condiciones de operación empleadas (medio acuoso y bifásico) así como en las distintas escalas de trabajo empleadas (agitador orbital y tanque agitado), se llevará a cabo el estudio cinético y de rendimiento de conversión de los compuestos presentes en distintas mezclas de DBT y Cx-DBT, en cada una de las condiciones anteriormente descritas.

Por otra parte, se ha realizado el estudio de una muestra real de hidrodesulfurado procedente de la empresa Repsol, en condiciones de *resting cell* en tanque agitado, para lo cual previamente se identificarán los compuestos más abundantes por HPLC-DAD, para los cuales se llevará a cabo el correspondiente estudio cinético y de rendimiento de conversión a lo largo de la reacción.

En el tercer bloque se estudiarán diversos aspectos relacionados con la mejora del proceso de biodesulfuración, con el objetivo de obtener los mejores rendimientos de desulfuración de DBT y de los compuestos Cx-DBT.

En primer lugar, se realizará el estudio de la adición de distintos surfactantes y codisolventes, determinando aquel que más favorece la reacción y ajustando posteriormente su dosis. El objetivo es disminuir los problemas de transferencia de materia existentes en condiciones bifásicas a escala de incubadora orbital, y mejorar el proceso de biodesulfuración.

Una vez considerado el efecto de los surfactantes en el proceso de biodesulfuración, se estudiará el efecto de la adición de distintas fuentes de carbono adicionales, las cuales estarán compuestas por sales de ácidos del ciclo de Krebs, de modo que se puedan generar los equivalentes reducidos e incorporarse a la ruta 4S, mejorando la actividad enzimática y la capacidad desulfurante tanto en condiciones acuosas como bifásicas.

Con el objetivo de estudiar la pérdida de actividad durante el proceso de desulfuración, se estudiará la reutilización del biocatalizador sometándolo a sucesivos ciclos de biodesulfuración en condiciones acuosas. De forma paralela, se estudiará el efecto de la adición de pulsos de piruvato en las etapas de reutilización sobre el proceso de biodesulfuración.

Por otra parte, se realizará el estudio del proceso de biodesulfuración de DBT y de sus derivados alquilados Cx-DBT en condiciones bifásicas en *resting cell*, utilizando biocatalizadores de distintas edades de crecimiento, para de ese modo ratificar el comportamiento observado en condiciones acuosas en trabajos previos.

Por último, se determinarán los requerimientos de oxígeno necesarios para que el biocatalizador realice los procesos de mantenimiento y de biodesulfuración en condiciones de *resting cell* en condiciones bifásicas, a escala de tanque agitado.

Por último, se estudiará la influencia del oxígeno suministrado en el proceso de desulfuración de DBT en las mismas condiciones, con el fin de optimizar las condiciones de aireación durante el proceso de biodesulfuración.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>2.1. EQUIPO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1.1. Fermentadores comerciales .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1.1.1. Biorreactor tanque agitado .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1.1.2. Columna de burbujeo de recirculación interna (<i>Air-lift</i>) .....</b>	<b>56</b>
<b>2.1.2. Unidad de control del fermentador Biostat® B y C .....</b>	<b>57</b>
<b>2.1.3. Electrodo de pH .....</b>	<b>58</b>
<b>2.1.4. Electrodo de oxígeno disuelto .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1.5. Medidor de flujo másico .....</b>	<b>59</b>
<b>2.2. EQUIPOS AUXILIARES .....</b>	<b>59</b>
<b>2.2.1. Autoclave .....</b>	<b>59</b>
<b>2.2.2. Incubarora orbital .....</b>	<b>59</b>
<b>2.2.3. Campana de flujo laminar .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.4. Balanza de precisión .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.5. Centrífugas .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.6. Microscopios .....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.6.1. Microscopio de luz transmitida .....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.6.2. Microscopio electrónico de barrido .....</b>	<b>61</b>
<b>2.3. MATERIALES EMPLEADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>2.3.1. Microorganismo .....</b>	<b>61</b>
<b>2.3.2. Reactivos utilizados.....</b>	<b>62</b>
<b>2.4. EQUIPOS DE ANÁLISIS.....</b>	<b>64</b>
<b>2.4.1. Espectrofotómetro de absorción UV-VIS .....</b>	<b>64</b>
<b>2.4.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) .....</b>	<b>65</b>
<b>2.4.3. Tensiómetro de anillo .....</b>	<b>65</b>
<b>2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>65</b>
<b>2.5.1. Protocolo de conservación y mantenimiento del biocatalizador .....</b>	<b>66</b>

2.5.2. Preparación de muestras de inóculo .....	66
2.5.3. Protocolo de crecimiento en biorreactor .....	67
2.5.4. Análisis de la capacidad desulfurante.....	68
2.5.5. Proceso de biodesulfuración .....	69
2.5.6. Protocolo de preparación de las muestras para su uso en microscopía .....	71
2.5.6.1. Microscopía de luz transmitida .....	71
2.5.6.2. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.).....	72
2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	73
2.6.1. Análisis de la biomasa.....	73
2.6.2. Determinación de los compuestos objeto de estudio .....	74
2.6.2.1. Análisis de la fase acuosa .....	75
2.6.2.2. Análisis de la fase orgánica .....	77
2.6.2.2. Análisis de los intermedios del ciclo de Krebs .....	80
2.6.3. Análisis cinético del crecimiento y de la biodesulfuración.....	80

El trabajo descrito en esta memoria ha necesitado de la utilización y puesta a punto de diversas técnicas de experimentación y métodos de análisis; a continuación se detallan cada una de ellas, así como los equipos y los materiales que han sido empleados.

## **2.1. EQUIPO EXPERIMENTAL**

Para llevar a cabo el crecimiento bacteriano, así como para realizar ensayos de biodesulfuración (BDS), se han utilizado agitadores orbitales y distintos fermentadores comerciales de diferente capacidad y configuración.

### **2.1.1. Fermentadores comerciales**

#### **2.1.1.1. Bioreactor tipo Tanque Agitado**

Se han utilizado dos tipos diferentes de bioreactores tipo tanque agitado, en función de la producción de biocatalizador. El bio-reactor de 2 litros se ha utilizado para pequeñas producciones de bacteria, así como paso intermedio de crecimiento (LB2), cuando se ha llevado a cabo un crecimiento en bioreactor de 15 litros.

<b>Volumen total</b>	3.0 L
<b>Volumen útil</b>	2.0 L
<b>Altura total</b>	285.0 mm
<b>Diámetro interno</b>	130.0 mm
<b>Número de agitadores</b>	2
<b>Ancho de la pala</b>	10.5 mm
<b>Diámetro del agitador</b>	53.0 mm

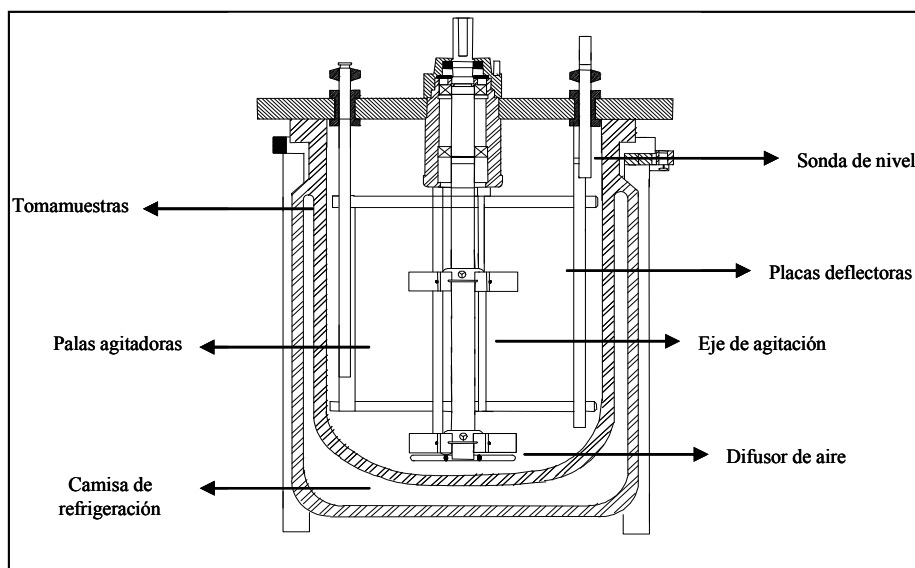
**Tabla 2.1. Dimensiones del tanque agitado BIOSTAT B 2L.**

Los fermentadores comerciales utilizados Biostat B 2L y Biostat C-15L de Braun-Biotech, diseñado de manera que todas las aplicaciones necesarias para la operación del fermentador, bomba de dosificación de ácido, base, sustrato y antiespumante, así como los módulos de medida y control, están combinados formando una unidad básica. Todos los parámetros de control de la unidad son controlados automáticamente, como son temperatura de trabajo, agitación, y entrada de caudal de gas (aire-nitrógeno). El control automático de la temperatura, se mantiene gracias a la

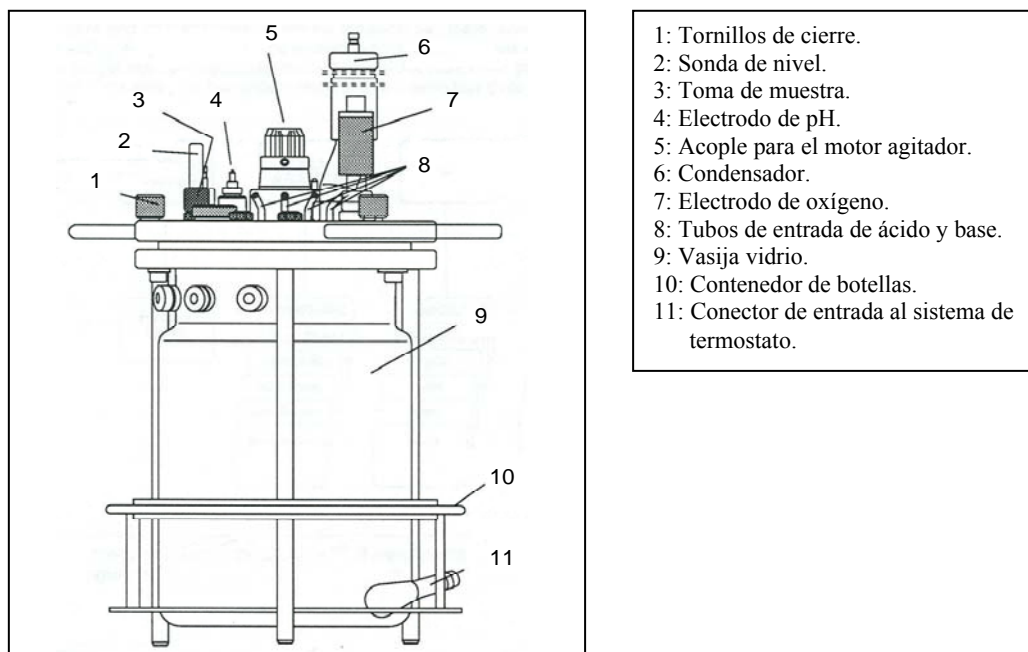
recirculación de agua por una doble camisa. El bioreactor de 2L está fabricado en vidrio de borosilicato y el bioreactor de 15L está fabricado en acero inoxidable.



**Figura 2.1.** Fotografía del tanque agitado de 2 litros utilizados en este trabajo.



**Figura 2.2.** Sección transversal del tanque agitado de 2L.



**Figura 2.3.** Esquema de los componentes que forman el tanque agitado de 2L.

<b>Volumen total</b>	22 L
<b>Volumen útil</b>	15 L
<b>Altura total</b>	1760 mm
<b>Diámetro interno</b>	880 mm
<b>Número de agitadores</b>	3
<b>Ancho de la pala</b>	250mm
<b>Diámetro del agitador</b>	85mm

**Tabla 2.2.- Dimensiones del tanque agitado BIOSTAT C-15L.**



**Figura 2.4.** Fotografía del tanque agitado de 15 litros utilizados en este trabajo.



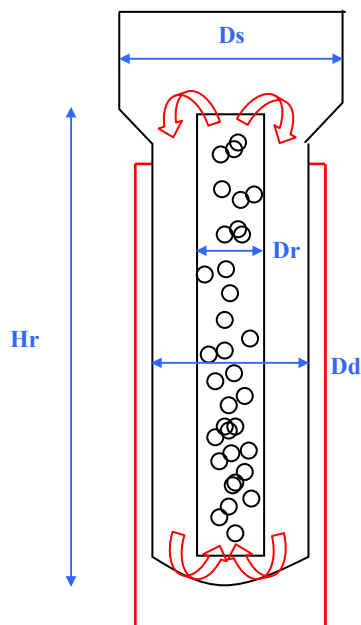
**2.1.1.2. Columna de Burbujeo de Recirculación Interna (Air-lift)**

Es un fermentador comercial Biostat B 2L Braun-Biotech, en la cual la unidad integrada para el bioreactor de 2L es la misma que para el tanque agitado. El reactor consta de una cuba de vidrio de 2L de capacidad, con un tubo concéntrico de acero inoxidable (raiser) que separa la sección de ascenso de la zona de descenso.

El suministro de gas se lleva a cabo mediante un anillo perforado dispuesto en la parte inferior del raiser. El caudal de gas se va a controlar con un rotámetro incorporado a la unidad.

Altura de la zona de ascenso, Hr	226.0 mm
Diámetro de la zona de ascenso, Dr	55.0 mm
Espesor de la zona de ascenso, Dr	10.0 mm
Diámetro de salida, Ds	128.0 mm
Diámetro zona de descenso, Dd	85.0 mm

**Tabla 2.3. Dimensiones de la columna de burbujeo con recirculación interna Biostat B 2L.**



**Figura 2.5. Esquema de la columna de burbujeo de recirculación interna.**



**Figura 2.6.** Fotografía del tanque tipo *air-lift* de 2 litros utilizado en este trabajo.

### ***2.1.2. Unidad de Control de Fermentador BIostat® B y BIostat® C***

Las unidades de control utilizadas para los distintos tipos de reactores incluyen sistemas de medida y control de la temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto.

#### **Sistema de Medida y Control de la Temperatura**

Los fermentadores BIostat® B y BIostat® C están equipados con un controlador digital PID. La temperatura del medio de cultivo, medida con un sensor Pt-100 actúa como consigna por el control de temperatura, actuando sobre la válvula de refrigeración y la resistencia eléctrica de 600 W y 7500 W, para los fermentadores de 2 y 15 L. La temperatura de operación es seleccionada y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0.1°C. El intervalo de medida se encuentra entre 0 y 100°C.

#### **Sistema de Medida y Control de la Agitación**

La velocidad de agitación de los fermentadores se controla mediante un controlador digital PID ajustando la velocidad a través de un motor de 180W y 900 W de potencia máxima, para los fermentadores de 2 y 15L respectivamente, que ejerce su

acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de seis palas planas. La velocidad de agitación se mide con un tacómetro ajustable entre 0 y 1200 rpm, con una resolución de 10 rpm.

La aireación del caldo se lleva a cabo suministrando aire por burbujeo, mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ , para que el aire se introduzca en el reactor estéril. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal. El caudal de aire se ajusta con una válvula y un rotámetro, y se puede regular automáticamente.

#### **Sistema de Medida y Control de pH**

La unidad también cuenta con un controlador digital PID para este caso, el cual actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y base en función de la señal de medida, previamente amplificada. Se utiliza un electrodo METTLER TOLEDO, cuyo rango de medida varía entre 2 y 12 unidades de pH. La calibración es realizada mediante un sensor digital.

#### **Sistema de Medida y Control de Oxígeno disuelto**

La unidad cuenta con un controlador digital PID de oxígeno disuelto en cascada, actuando directamente sobre la velocidad de agitación, es decir, sobre la velocidad de giro del agitador. La medida de la concentración de oxígeno disuelto se realiza sobre un electrodo esterilizable HAMILTON, cuyo rango de medida varía entre 0 y 100%. La calibración se realiza con un sensor digital.

#### ***2.1.3 Electrodo de pH***

Se utiliza un electrodo combinado de pH 405-DPAS-SC-K8S/200 de METTLER TOLEDO de Ag/AgCl, cuyo rango de medida varía entre 0 y 12 unidades de pH y permite una temperatura máxima de 130°C. El calibrado del electrodo se

realiza con un sensor digital y utilizando patrones comerciales de medida de pH 4.0 y 7.0 para obtener la curva de calibrado correspondiente. El control de pH en el interior del fermentador se consigue mediante un controlador PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y base.

#### ***2.1.4. Electrodo de O<sub>2</sub> disuelto***

Para la medida del oxígeno disuelto se ha utilizado un electrodo de O<sub>2</sub> disuelto polarográfico esterilizable de OXYFERM FDA 225 de HAMILTON. Esta constituido por un cátodo de platino y un ánodo de Ag/AgCl conectados conductimétricamente por un electrolito, separados por una solución mediante una membrana permeable al gas.

Antes del uso del electrodo de oxígeno es necesario realizar el calibrado del mismo. Para ello es necesario conectar el electrodo de oxígeno a la unidad al menos dos horas antes del mismo para su polarización. Posteriormente, el calibrado se realiza en las mismas condiciones de operación (velocidad de agitación, temperatura, caudal de aire y composición del medio) que se van a utilizar en el proceso de crecimiento o ensayo.

El 0% en concentración de O<sub>2</sub> se consigue por la eliminación de oxígeno disuelto mediante el burbujeo constante de nitrógeno. El 100% de saturación se logra con una corriente de aire a caudal elevado.

#### ***2.1.5. Medidor de flujo másico***

El caudal de aire introducido en el reactor a través del difusor de gas se ha determinado utilizando un medidor de flujo másico GFM37 AALBORG, con un intervalo de operación de 0 a 20 L/min en condiciones estándar, y un tiempo de respuesta de 2 segundos, con una variación de  $\pm 2\%$ .

## **2.2. EQUIPOS AUXILIARES.**

### **2.2.1. Autoclave**

La esterilización de todos los medios y materiales se ha realizado en un autoclave RAYPA, modelo AE-110-DRY, con capacidad de 110L.

### **2.2.2. Incubadoras orbitales**

Para llevar a cabo la preparación de preinóculo y para la realización de ensayos a escala de Erlenmeyer se han utilizado dos incubadoras orbitales, modelos CERTOMAT® H y B. Braun- Biotech S.A.

Ambas incubadoras permiten el control de temperatura entre 5 y 70 °C, control de agitación entre 0 y 400 rpm, y con capacidad para 25 Erlenmeyer.

### **2.2.3. Campana de flujo laminar**

Se ha empleado una cámara de flujo vertical marca EUROAIRE modelo ASB120, para las operaciones de manipulación que requerían condiciones de esterilidad.

### **2.2.4. Balanza de precisión**

Para la cuantificación del peso de los diferentes compuestos empleados se ha utilizado una balanza digital SARTORIUS, modelo BP610. Esta balanza permite obtener pesadas del orden de miligramos con una fiabilidad de  $\pm 0,1$  mg.

### **2.2.5. Centrífugas**

Para llevar a cabo la centrifugación de los caldos de cultivo se ha utilizado una centrífuga refrigerada programable de la marca EPPENDORF modelo 5804R. El intervalo de temperatura es de -9°C a +40°C. Esta centrífuga posee un rotor con capacidad máxima de carga de 6 x 85 mL y una velocidad máxima de agitación de 16100 rpm.

La centrifugación del caldo de cultivo procedente del tanque agitado de 15L se ha procesado utilizando una centrífuga en continuo, con tambor autodeslodante tipo SD 1-06-107. Esta centrífuga posee un tambor de 1L de volumen, y una capacidad

máxima de centrifugado de líquido de 300L/h, y un motor de 1.1 KW de potencia. Para introducir el caldo a la centrífuga, se utilizó una bomba peristáltica Watson Marlow IP 31/66 Serie 500, con un caudal máximo de 4.4 L/min.

La centrifugación de las muestras se ha llevado a cabo en una centrífuga no refrigerada marca EPPENDORF modelo 5415D. Esta centrífuga dispone de un rotor con capacidad máxima de 14 x 1.5 mL. La velocidad máxima de agitación es de 16100 rpm.

### ***2.2.6. Microscopios***

#### ***2.2.6.1. Microscopio de luz transmitida***

Para llevar a cabo el examen morfológico de las muestras a lo largo del crecimiento, y de ese modo determinar la presencia de otros microorganismos, se ha utilizado un microscopio de luz transmitida ZEISS modelo KF2 ICS, dotado con una bombilla halógena de 10W, y un revolver de 6 lentes de aumentos variables entre 10 y 100x.

#### ***2.2.6.2. Microscopio electrónico de barrido***

Se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido digital ZEISS DSM 950, perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de la UAH. Posee una resolución entre 4-5 nm, y los aumentos se encuentran entre 2x, a 50 mm de distancia de trabajo, y 15x, a 7 mm de distancia de trabajo. Además posee memoria de imágenes y un sistema de fotografía Polaroid, así como un dispositivo automático de exposición.

### ***2.3. MATERIALES EMPLEADOS***

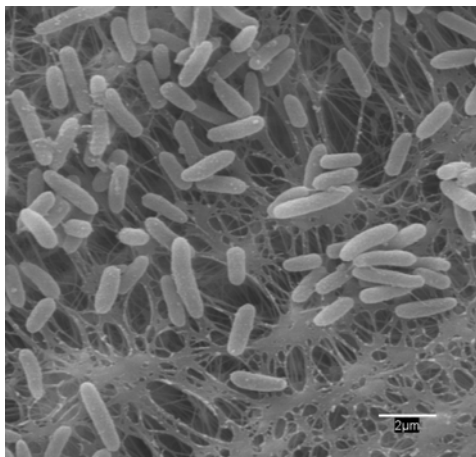
#### ***2.3.1. Microorganismo***

El microorganismo empleado ha sido *Pseudomona putida* CECT5279, suministrado por el equipo del doctor José Luis García López del Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.- C.S.I.C. Madrid).

Este microorganismo es aerobio y gram negativo, el cual ha sido modificado genéticamente, debido a su elevada tolerancia a los disolventes orgánicos.

La modificación consiste en la inclusión del vector de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 donde se encuentra la información para la producción de los enzimas responsables de desarrollar la ruta de desulfuración, (conjunto de genes dszA, dszB, dszC). El gen de la flavin- óxido-reductasa, hpaC, (ó dszD), responsable del aporte de FMNH<sub>2</sub> que requieren las mono-oxigenasas DszC y DszA, procede de la bacteria *Escherichia coli*.

Además, esta bacteria cuenta con un gen de resistencia a la tetraciclina, antibiótico que protegerá los cultivos de posibles contaminaciones. Para que se active la síntesis de las proteínas es necesario que esté presente en el medio isopropil  $\beta$ -D-tiogalacto-piranosido (IPTG), que actúa como inductor.



**Figura 2.7. Fotografía de *Pseudomonas putida* CECT5279 obtenida por S.E.M.**

### 2.3.2. Reactivos utilizados

En la siguiente tabla se muestran los reactivos empleados para la conservación, crecimiento y conservación del microorganismo.

Medio	Reactivo	Concentración	Marca	Pureza
<b>LB<sup>1</sup></b>	Extracto de Levadura	5 g/L	Fluka	>99.5%
	Cloruro sódico	10 g/L	Fluka	99.0%
	Tryptona	10 g/L	Pronadisa	>99.9%
	Agar	10 g/L	Sigma-Aldrich	99.0%
	Tetraciclina	1g/L	Sigma-Aldrich	99.0%
<b>BSM<sup>2</sup></b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4 g/L	Panreac	99.0%
	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	3.05 g/L	Panreac	99.9%
	NH <sub>4</sub> Cl	2 g/L	Panreac	99.5%
	MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	24.5 mg/L	Panreac	98.0%
	Glicerol	2 g/L	Panreac	99.0%
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 mg/L	Scharlau	99.5%
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 mg/L	Panreac	98.0%
	IPTG <sup>3</sup>	43.2 mg/L	Sigma-Aldrich	99.9%
	Tetraciclina	9.1 mg/L	Sigma-Aldrich	99.0%
<b>Fuente de Carbono</b>	Ácido L-Glutámico	20 g/L	Sigma-Aldrich	99.0%
<b>Fuente de Azufre</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	440 mg/L	Panreac	98.0%

<sup>1</sup> medio de Luria Bertani; <sup>2</sup> medio salino basal; <sup>3</sup> isopropil β- D-tiogalacto- piranosido.

Tabla 2.4. Reactivos empleados en la conservación, mantenimiento y crecimiento del microorganismo.

En la Tabla 2.5 y 2.6, se recogen los surfactantes y reactivos empleados en los ensayos de biodesulfuración.

Medio	Concentración	Marca	Pureza
Tween 85	0.2-1% v/v	Sigma-Aldrich	Grado microbiológico
Tween 20	0.2-1% v/v	Sigma-Aldrich	
SDS	0.2-1% v/v	Fluka	
Tritón X-100	0.2-1% v/v	Sigma-Aldrich	

Tabla 2.5. Surfactantes empleados en los ensayos de biodesulfuración



Medio	Concentración	Marca	Pureza
HEPES*	50 Mm	Sigma-Aldrich	>99.5%
Hexadecano	varía	Sigma-Aldrich	99.0%
Dibenzotiofeno (DBT)	varía	Sigma-Aldrich	99.0%
Dibenzotiofeno sulfóxido (BDTO)	varía	Sigma-Aldrich	97.0%
Dibenzotiofeno sulfona (DBTO2)	varía	Sigma-Aldrich	97.0%
2- hidroxibifenilo (HBP)	varía	Sigma-Aldrich	>99.0%
4mDBT	varía	Sigma-Aldrich	96.0%
4,6dmDBT	varía	Sigma-Aldrich	97.0%
4,6deDBT	varía	Sigma-Aldrich	97.0%
Etanol	≤ 1% (v/v)	Panreac	96.0%
Piruvato de sodio	1-5 g/L	Sigma-Aldrich	>99.0%
Succinato de sodio	1-5g/L	Sigma-Aldrich	99.0%
Citrato de sodio	1-5g/L	Panreac	99.5-100.5%

\* [N-2-Hidroxietil ]piperazine-N´-(2-ácido etanosulfónico), ajustado a pH= 8.

**Tabla 2.6. Reactivos empleados en los ensayos de biodesulfuración.**

En la siguiente tabla se reflejan los reactivos empleados para el análisis de las muestras.

Medio	Utilidad	Marca	Pureza
Acetonitrilo	HPLC	Scarlau	99.85%
Acetato de etilo	HPLC	Panreac	99.0%
HCl*	HPLC	Panreac	37.0%
Nitrógeno	HPLC	Air Liquide	100%

\* Para la acidificación de muestras.

**Tabla 2.7. Reactivos empleados para el análisis**

En la tabla 2.8 aparecen los reactivos empleados para la preparación de las muestras que han sido analizadas por microscopia convencional y por microscopia electrónica de barrido.

<b>Medio</b>	<b>Utilidad</b>	<b>Marca</b>	<b>Pureza</b>
Glutaldehido	S.E.M.	Fluka	>98%
Acetona	S.E.M.	Panreac	99%
Etanol absoluto	S.E.M.	Panreac	>96.0%
Sulfato cúprico	S.E.M.	Sigma-Aldrich	90.0%
Cacodilato sódico	S.E.M.	Fluka	>98.0%
Cristal Violeta	T.D.G.	Panreac	90.0%
Lugol	T.D.G.	Panreac	90.0%
Safranina	T.D.G.	Panreac	90.0%

*T.D.G. : \_Tinción diferencial Gram; S.E.M. : \_Espectroscopia electrónica de barrido.*

**Tabla 2.8. Reactivos empleados para microscopia convencional y S.E.M..**

## **2.4. EQUIPOS DE ANÁLISIS**

### **2.4.1. Espectrofotómetro de absorción UV-VIS.**

Las medidas de absorbancia se han llevado a cabo en un espectrofotómetro UV/VIS VARIAN, modelo CARY100 BIO. Las características del equipo se detallan a continuación:

- Intervalo de medida de longitudes de onda comprendido 190 – 900 nm.
- Anchura de banda espectral de  $5\pm 0.5$  nm.
- Lámpara halógena de tungsteno (lámpara WI), con una fuente de luz en el intervalo del visible y del infrarrojo próximo.
- Lámpara de deuterio (lámpara D2), con fuente de luz en el intervalo del ultravioleta.

### **2.4.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).**

Se ha empleado un equipo HPLC VARIAN, que está compuesto por los siguientes módulos:

- Bomba Varian modelo Prostar 230, el cual permite trabajar en régimen isocrático y en gradiente, modificando el caudal (intervalo 0.01-10 mL/min). y la composición, ya que está dotado de un mezclador de tres canales.
- Inyector automático Varian modelo Prostar 410 con capacidad para 84 viales

de 2 mL y de 3 viales de 10 mL de volumen.

- Detector diode-array Varian modelo Prostar 335, que posee una lámpara ultravioleta que permite trabajar con longitudes de onda de entre 190-950nm.
- Los datos fueron recogidos y tratados con el software Galaxie 1.9. de Varian.

#### ***2.4.3. Tensiómetro de anillo***

Para la medida de la tensión superficial e interfacial se ha utilizado un tensiómetro de anillo en el Departamento de Química-Física de la UAH, modelo CSC Scientific Co. Inc. Dunouy modelo 70545, con una precisión de medida de  $\pm 0.05$  dyna/cm y un intervalo de tiempo de lectura de 15-30 segundos.

### ***2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL***

Para llevar cabo estudios de procesos en los que se ven implicados microorganismos como biocatalizadores, es necesario desarrollar métodos de conservación, mantenimiento y producción, así como desarrollar métodos experimentales estandarizados (preparación de inóculos, realización de ensayos en incubadora y fermentador, test de desulfuración, etc...) con el objetivo de alcanzar el mayor grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en los experimentos, de modo que se reduzca en lo máximo de lo posible el error experimental.

#### ***2.5.1. Protocolo de conservación y mantenimiento del biocatalizador.***

Para llevar a cabo la conservación se desarrollaron dos métodos distintos en función del tiempo de conservación previo a la utilización:

-A corto plazo. Se preparan placas de LB-agar, con la adición de tetraciclina. El método de siembra utilizado es por agotamiento, y se mantiene 24 horas como máximo.

-A largo plazo. La activación de las células se lleva a cabo en 50 mL de medio LB, al cual se le añade microorganismo crecido en placa petri, y con la adición de 250  $\mu$ L de tetraciclina. Este proceso se lleva a cabo utilizando Erlenmeyers de 250 mL, en incubadora orbital a 30°C de temperatura y con 250 rpm de agitación durante 12 horas

de crecimiento. Una vez crecida, se inocula 0.1 g/L de bacteria en medio LB, con adición de 250  $\mu$ L de tetraciclina, en las mismas condiciones que en el caso anterior, durante 3-4 horas.

Transcurrido las dos etapas de activación y reproducción, el caldo obtenido se centrifuga a 7000 rpm y 20°C de temperatura. El sobrenadante se elimina y el pellet se resuspende en una mezcla de suero salino- glicerol previamente esterilizada y con una relación de volumen 1:1, hasta obtener una concentración de 30 g/L de bacteria. El medio posteriormente se reparte en Eppendorf estériles y se almacena a -80°C. De este modo la bacteria se conserva durante seis meses, transcurridos los cuales se renueva el stock.

### ***2.5.2. Preparación del inóculo.***

Para la preparación del preinóculo, se parte bien de bacteria sembrada en placa petri, para el cual se añaden tres asas, o bien añadiendo 150  $\mu$ L de 30 g/L de stock conservado a -80°C y 250  $\mu$ L de tetraciclina en 50 mL de LB. Esta etapa se lleva a cabo en incubadora orbital, a 30°C de temperatura y 250 rpm de agitación durante 12 horas de crecimiento.

Transcurrido ese tiempo se mide la densidad óptica a 600 nm para la inoculación de 0.1 g/L de inóculo en otros Erlenmeyers que poseen LB estéril y tetraciclina, ajustado a un volumen total de 50 mL como en el primer paso si el crecimiento es en bioreactor de 2 litros, o bien en fermentador de 2 litros, si el crecimiento se lleva a cabo en bioreactor de 15 litros, para lo cual se ajusta la concentración a dos litros totales de LB, al cual se le han añadido 1.82 mL de tetraciclina.

Posteriormente tras 4 horas de crecimiento, se vuelve a medir la densidad óptica a 600 nm, para cada uno de los casos, ajustando la concentración de inóculo a 0.1 g/L y 0.05 g/L para bio-reactor de 2 y 15 litros respectivamente.

### ***2.5.3. Protocolo de crecimiento en biorreactor.***

El crecimiento se lleva a cabo en dos fermentadores comerciales tipo tanque agitado de distinta capacidad, 2 y 15 litros en el caso de tanque agitado y tipo *airlift* de 2L de capacidad (Biostat® B y Biostat® C15 Biotech) en función de la producción de biocatalizador.

En todos los crecimientos se han utilizado las mismas concentraciones de medio salino basal, así como de fuente de carbono y de azufre utilizada, siendo ácido glutámico (20 g/L) y sulfato de magnesio (0.44 g/L). Las condiciones de operación han sido las mismas en los biorreactores tipo tanque agitado de distinta escala utilizados, siendo de 30°C, y un caudal de aire de 2L/min y sin control de pH, con una edad de crecimiento de 10-12 horas, a excepción de la velocidad de agitación que fue varío entre 50 y 250 rpm, para el tanque de 15L y 250 rpm para el tanque de 2L.

En los crecimientos realizados en el *airlift* de 2L de capacidad, se mantuvieron la composición y las condiciones de operación, pero sin embargo se modificó el caudal de aireación, trabajándose a 2, 4 y 8 L/min.

En todos los casos, se detuvo el crecimiento a las 10-12 horas y se recogió el caldo en tubos estériles de centrífuga de 70 y 250 mL, en función del bioreactor empleado, y se centrifugó a 7000 rpm, 20°C, durante 5 minutos.

El pellet obtenido se resuspendido en una mezcla 1:1 de suero salino y glicerol, el cual se conserva a -20°C hasta su utilización.

El seguimiento de todos los crecimientos se realizó con el registro automático de datos, a través del programa MFCS WIN 2.1, con el cual se recogían los valores de oxígeno disuelto, agitación, temperatura y pH en cada momento y se tomaron muestras de 2 mL de caldo para realizar medidas de densidad óptica.

En la figura 2.8 se muestra el esquema de trabajo realizado en el proceso de producción de *P. putida* CECT5279, las cuales comprende las etapas de preinóculo, inóculo y crecimiento en bioreactor comercial para las escalas de 2 litros (tanque agitado y *air-lift*) y 15 litros (tanque agitado).

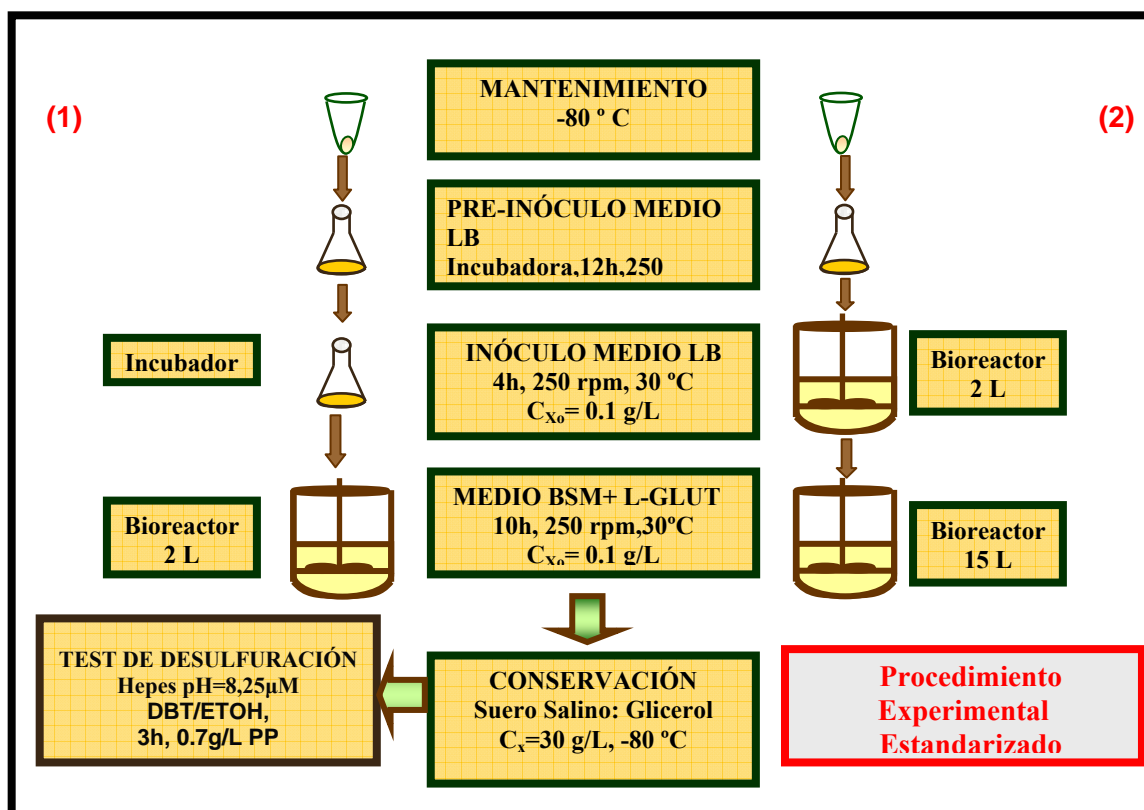


Figura 2.8. Esquema de etapas de pre-inóculo, inóculo y crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 en bioreactor comercial para las escalas de 2 (1) y 15 (2) litros.

#### 2.5.4. Análisis de la Capacidad Desulfurante

Con el objeto de determinar la capacidad desulfurante del microorganismo a lo largo del crecimiento, se ha utilizado un ensayo estándar denominado *resting cell*. En dicho ensayo se parte del microorganismo crecido en medio BSM y conservado en una mezcla de glicerol- suero salino en una proporción del 50%. En todos los experimentos se fija la concentración inicial de biomasa en 0.7 g/L para poder comparar los resultados posteriormente. Todos estos ensayos se han llevado a cabo en Erlenmeyers de 10mL, utilizando como fase tampón HEPES a pH=8 y una concentración inicial de DBT de 25  $\mu\text{M}$ . Una vez inoculado el microorganismo en el Erlenmeyer, se deja actuar durante 3 horas, y se recoge 0.5 mL de muestra final en un Eppendorf, al que previamente se le ha añadido 0.5 mL de acetonitrilo. Esta muestra es centrifugada a 12000 rpm durante 5 minutos, con el fin de separar la fase sólida de la líquida. Posteriormente, de estas muestras son analizadas mediante HPLC la concentración de dibenzotiofeno (DBT) consumido, así como la concentración de los distintos intermedios de la ruta de desulfuración que pueden acumularse: dibenzotiofeno

sulfóxido (DBTO), dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>), hidroxibifenilbencenosulfonato (HBPS) y 2-hidroxibifenilo (HBP) producidos a lo largo del ensayo.

El rendimiento del proceso de BDS se determina con el porcentaje de desulfuración ( $X_{BDS}$ ), definido como la relación de la concentración de producto final libre de azufre (HBP) y la concentración inicial de sustrato (DBT) añadido al medio de reacción:

$$X_{BDS}(\%) = \left( \frac{C_{HBP_i}}{C_{DBT_0}} \right) \cdot 100 \quad (2.1)$$

El grado de desulfuración ( $D_{BDS}$ ) se utiliza para cuantificar la capacidad desulfurante a lo largo del crecimiento bacteriano, teniendo en cuenta el porcentaje de desulfuración obtenido a cada tiempo, junto con la concentración de biomasa alcanzada. El grado de desulfuración puede definirse a través de la ecuación:

$$D_{BDS} = \frac{X_{BDS} \cdot C_X}{t_G} \quad (2.2)$$

Donde  $t_G$  es el tiempo de crecimiento necesario para alcanzar la concentración  $C_X$  y  $X_{BDS}$  es el porcentaje de BDS obtenido por el ensayo estándar de *resting cell*, anteriormente comentado.

#### ***2.5.5. Proceso de biodesulfuración.***

Los ensayos de biodesulfuración se han llevado a cabo utilizando en primer lugar dibenzotiofeno (DBT), utilizado como compuesto modelo, debido a que se trata de uno de los compuestos recalcitrantes más abundantes en las corrientes de salida de las fracciones tratadas por hidrodesulfuración, así como hexadecano como fase orgánica modelo.

Otros compuestos organosulfurados utilizados en este trabajo han sido derivados alquilados de DBT, como son 4-metil-dibenzotiofeno (4MDBT), 4,6-dimetildibenzotiofeno (4,6DMDBT) y 4,6-dietildibenzotiofeno (4,6DEDBT), estos

compuestos recalcitrantes no son eliminados tras el proceso de hidrodesulfuración, y por esa razón son objeto de estudio en este trabajo.

En todos los casos los ensayos de biodesulfuración se han llevado a cabo en *resting-cell* o en parada de crecimiento. Para los ensayos en medio bifásico, los compuestos DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT, 4,6DEDBT se han disuelto en hexadecano como fase orgánica, y HEPES a pH=8 como fase acuosa. Del mismo modo se llevaron a cabo en fase acuosa, empleando estos mismos compuestos, disueltos previamente en etanol, y utilizando HEPES a pH=8 como fase de reacción.

Los ensayos de biodesulfuración se llevaron a cabo utilizando Erlenmeyers de 100 y 250 mL a escala de incubadora orbital y en biorreactor, tanque agitado de 2 litros. Todos los ensayos se llevaron a cabo con unas condiciones de operación de 30°C y 250 rpm. En los ensayos en tanque agitado también se ajustó el caudal de oxígeno a 1L/Lmin, cuyo porcentaje inicial de saturación de oxígeno era del 100%, aunque también se han llevado a cabo ensayos con distintos caudal y proporción de oxígeno.

El seguimiento de la desulfuración de estos ensayos, se realiza tomando alícuotas de 0.5 mL a lo largo de la reacción en los Erlenmeyers o reactor, a distintos tiempos, en función de si se trata de un ensayo acuoso u orgánico, ya que la duración de los mismos varía entre 3 horas, para ensayos acuosos y 5 horas, para ensayos orgánicos. De modo que el volumen total de muestreo a lo largo de la reacción, no supere el 10% del volumen total de reacción, ya que podrían modificarse las condiciones iniciales del ensayo. Cuando se trata de ensayos con volumen pequeño (5 mL en total) las fases se separan al final.

Posteriormente las muestras son recogidas en Eppendorfs, que contienen acetonitrilo, en el caso de muestras acuosas, y acetato de etilo en el caso de muestras orgánicas. Dichas muestras son centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos. De estas muestras se analiza posteriormente, mediante HPLC, la concentración de DBT consumido, y los compuestos de la ruta 4S, así como de los distintos compuestos alquilados consumidos a lo largo de la reacción. De este modo es posible determinar la conversión de cada uno de los compuestos, el cual se calcula de la siguiente manera:



$$Y_{BDS} = \frac{\Delta C_j}{C_{DBT,0}} \quad (2.3)$$

siendo  $\Delta C_j = C_{DBT,0} - C_{DBT}$  para DBT. Para los compuestos alquilados, la conversión de cada uno de ellos, se calcula del siguiente modo:

$$Y_{BDS} = \frac{\Delta C_j}{C_{xDBT,0}} \quad (2.4)$$

siendo  $\Delta C_j = C_{xDBT,0} - C_{xDBT}$  para cada derivado de DBT alquilado.

### ***2.5.6. Protocolo de preparación de las muestras para su uso en microscopía***

#### ***2.5.6.1. Microscopía de luz transmitida***

Para llevar a cabo el análisis morfológico de la bacteria utilizada en este trabajo, es necesario hacer una tinción diferencial Gram negativo. Gracias a este tipo de tinción es posible diferenciar bacterias de distinta naturaleza, debido a que las bacterias Gram +, poseen una pared celular formada por una capa gruesa de péptido glicano, y sobre la membrana plasmática tienen una delgada capa de pared celular pero, sobre esta, poseen otra capa membranosa de alto contenido lipídico.

Este tipo de tinción sirve para diferenciar estructuras y procede del siguiente modo:

- En primer lugar es necesario hacer un frotis bacteriano.
- Se añade Cristal Violeta, que es un colorante primario que tiñe el citoplasma y la pared celular, se deja secar dos minutos y se lava con agua destilada.
- En el siguiente paso se añade Lugol, para aumentar la tinción, y se lava con agua tras un minuto.
- Se lava con alcohol 96, dos o tres veces y se deja actuar unos segundos, posteriormente se lava con agua destilada el exceso alcohol.
- Se añade un colorante secundario, como es la safranina, y se deja reposar un minuto, y finalmente se lava con agua destilada.

El alcohol en el cuarto paso, se utiliza porque disuelve los lípidos y abre los poros (por donde escapan los colorantes añadidos). En las bacterias Gram +, el alcohol provoca que el péptido glicano se concentre, reteniendo el colorante. En el caso de las Gram -, apenas poseen péptido glicano, pero sí muchas cantidad de lípidos, por lo que el cristal violeta no se retiene, así que, tras echar la safranina, quedan decoloradas por estas y toman un color rosado.

#### **2.5.6.2. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.)**

La S.E.M. es utilizada ampliamente en biología molecular, permitiendo la apreciación de texturas y objetos en tres dimensiones que hayan sido pulverizados metálicamente antes de su observación. Por esta razón solo pueden ser observados organismos inertes, y permite su observación y caracterización superficial. Los microscopios electrónicos sólo pueden ofrecer imágenes en blanco y negro puesto que no utilizan luz. El uso de esta técnica permite realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de las bacterias utilizadas en este trabajo. Por otro lado permite el procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

Para poder obtener las imágenes a través de S.E.M., es necesario preparar las muestras es necesario seguir el protocolo que se describe a continuación:

- Fijación de la muestras en un soporte metálico adecuado. Para ello es necesario filtrar las bacterias usando filtro Fluoropore (Millipore FGLPO1300, 13 mm de radio y tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ).
- Se introducen las muestras en un recipiente, formado por cápsulas de papel Whatman N°1.
- Fijación-deshidratación. Los recipientes de papel se introducen con pinzas en un recipiente que posee 30 mL de acetona anhidra.
- Fijación. Con el uso de glutaraldehído 5% (v/v) en cacodilato sódico 0.2M, pH 7.2, y a temperatura ambiente se consigue la fijación.
- Lavado, se utiliza tampón cacodilato sódico 0.2 M a Ph 7.2, para eliminar el exceso de mezcla fijadora, y posteriormente se deshidrata nuevamente con acetona anhidra.

- Punto crítico de secado. En el cual se desplaza la acetona anhidra con CO<sub>2</sub> líquido que luego es eliminado por vaporización a 30-40°C, al final del proceso se consigue la ausencia de líquidos.
- Etapa de metalizado. Las muestras se retiran del papel Whatman con el uso de pinzas. Se adhieren posteriormente a un portamuestras cilíndrico de aluminio de unos 15 mm de diámetro utilizando un adhesivo de doble cara, y ya se encontrarían preparadas para su observación. El proceso de metalizado consiste en cubrir la muestra con una fina capa de oro (30 nm), la cual va a ser opaca a los electrones, y va a permitir su reflexión.
- Observación y recogida de las imágenes en el ordenador.

## ***2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS***

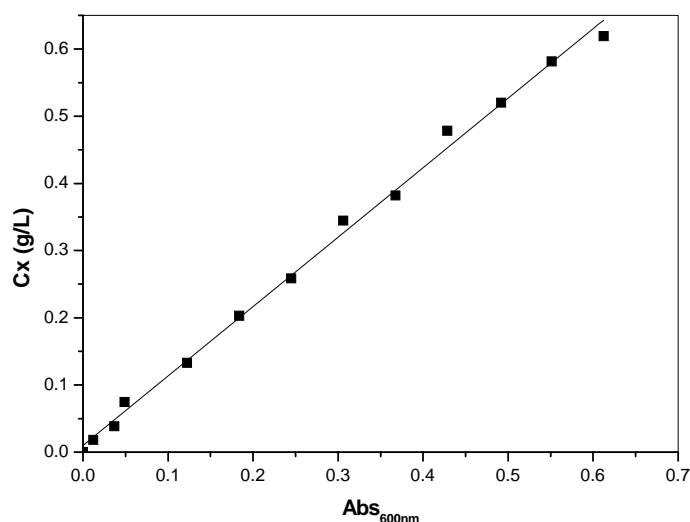
### ***2.6.1. Análisis de la biomasa.***

Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento del microorganismo se ha utilizado un método de análisis de la concentración de biomasa basado en la medida de la densidad óptica del caldo.

Las medidas de densidad óptica se han realizado con un espectrofómetro de absorción UV/VIS (VARIAN, modelo CARY100 BIO) a una longitud de onda de 600 nm. Para obtener la relación entre densidad óptica del caldo y la concentración celular en peso seco, se incubó un inóculo a 30°C y 250 rpm. Cuando se alcanza una densidad óptica elevada parte del caldo se filtra con un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro, y se seca durante 24 horas a 100 °C. Con el resto de caldo se realizan diluciones seriadas, y se mide la densidad óptica de las mismas. De esta forma se obtienen datos de concentración de peso seco de biomasa densidad óptica, que posteriormente se representan gráficamente y se ajustan por regresión lineal a la expresión de Lambert-Beer, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$C_x(\text{g/L}) = 0.03246 + 0.9982 (\text{Abs}_{600\text{nm}} - 0.0676) \quad r^2 = 0.9938 \quad (2.5)$$

La representación gráfica de la curva de calibrado del biocatalizador *P. putida* CECT5279 en medio BSM se muestra en la siguiente figura:



**Figura 2.9.** Recta de calibrado para *Pseudomonas putida* CECT5279, en medio de crecimiento BSM.

La medida de la biomasa en los crecimientos bacterianos llevados a cabo en los distintos fermentadores de tamaño y configuración, se realizaba siguiendo un protocolo experimental, en el cual se toman las muestras del biorreactor, y se diluyen con agua milliQ, de modo que la absorbancia medida en el espectrofotómetro se encuentre dentro de la región lineal de la curva de calibrado. El valor de la absorbancia medido a 600 nm es convertido en concentración por la ecuación (2.5); dicha concentración es luego corregida de acuerdo a la dilución realizada previamente. Estas curvas se renuevan periódicamente al renovar el stock de células.

### 2.6.2. Determinación de los compuestos objeto de estudio.

La cuantificación de los distintos compuestos implicados en las reacciones de biodesulfuración, en los cuales cabe destacar los compuestos pertenecientes a la ruta 4S, así como a los derivados alquilados de DBT. También fueron analizados el piruvato de sodio, citrato de sodio y succinato de sodio, en aquellos ensayos en los que fueron utilizados. El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía líquida, para lo que fue necesario desarrollar los métodos correspondientes de análisis en fase acuosa y en fase orgánica.

Los compuestos cuantificables son el DBT (dibenzotiofeno), DBTO (dibenzotiofeno sulfóxido), DBTO<sub>2</sub> (dibenzotiofeno sulfona) y HBP (2-hidroxibifenilo), como compuestos pertenecientes a la ruta 4S. Los derivados alquilados de DBT analizados fueron 4-metil-DBT, 4,6-dimetil-DBT y 4,6-dietil-DBT.

El tratamiento de las muestras consiste en la recogida de 1 mL de la misma, la cual se centrifuga a 12000 rpm, durante 5 minutos a 20°C. En el caso de las muestras acuosas, se añade previamente acetonitrilo al tubo eppendorf, de ese modo se evita la pérdida de compuestos hidrofóbicos que pueden adherirse con el pellet en la centrifugación. En los ensayos bifásicos, la centrifugación permite la separación de la emulsión en tres fases, pellet, fase acuosa y fase orgánica, donde esta última queda diferenciada en la parte superior del tubo eppendorf.

Posteriormente se toman alícuotas de la fase orgánica y de la fase acuosa, para analizarlas por cromatografía líquida por distintos métodos.

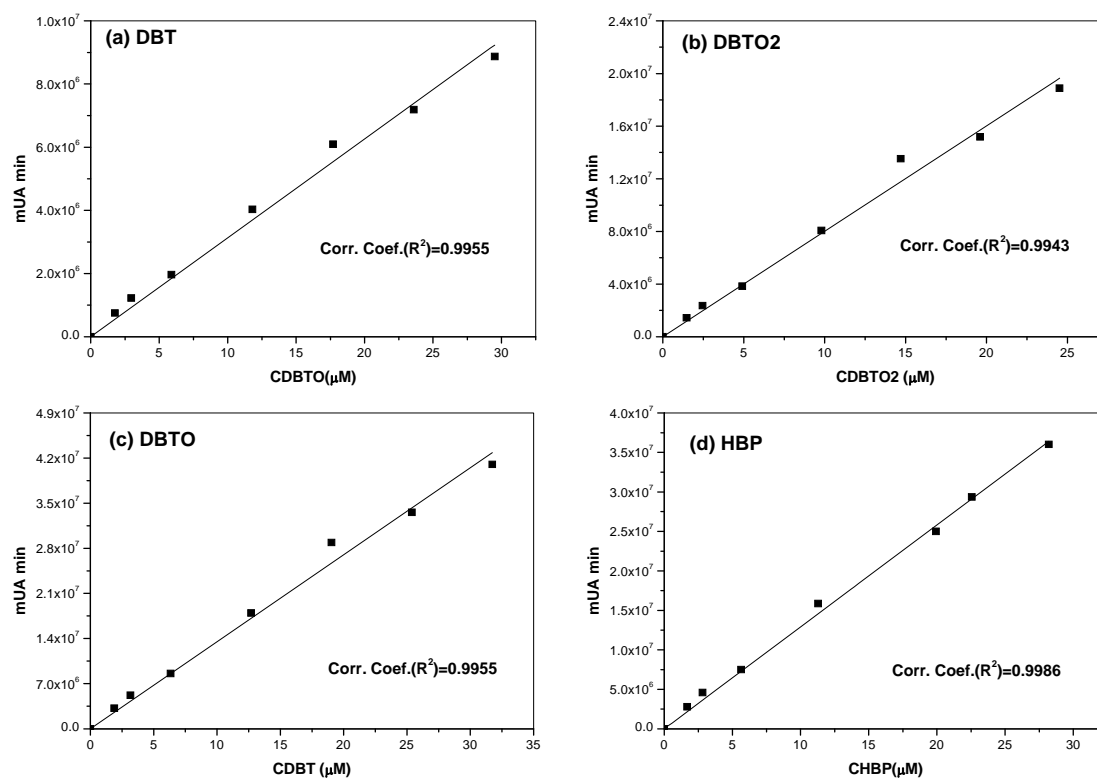
#### ***2.6.2.1. Análisis de la fase acuosa.***

Se utilizó una columna C8 Phenosphere de Phenomenex, de dimensiones 150 x 4.60 mm de 3 µm de diámetro interno, en elución isocrática con 50 % acetonitrilo y 50 % de agua, con un flujo de 1 mL/min. El DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub> se detectan a 239 nm y HBP a 210 nm y un volumen de inyección es de 60 µL.

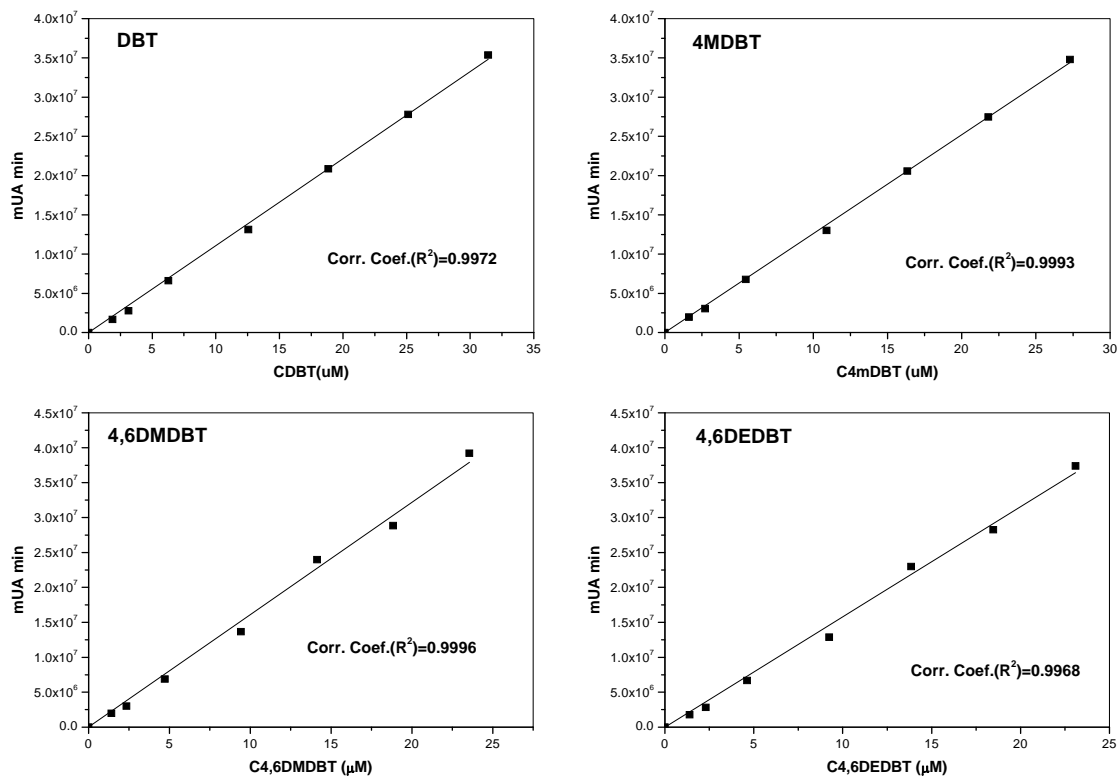
La representación gráfica de las rectas de calibrado correspondientes al DBT y a los intermedios de la ruta 4S (DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP), se muestran en la figura 2.6.

Para el análisis de los derivados alquilados (4MDBT, 4,6-DMDBT y 4,6-DEDBT) y DBT, se trabaja con una fase móvil compuesta por 50 % acetonitrilo y 50 % de agua, con un flujo de 1 mL/min, y la detección se llevó a cabo a 239 nm. En ambos casos, el volumen de inyección fue de 60 µL.

La figura 2.10 muestra las rectas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los compuestos C<sub>x</sub>-DBT (DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT).



**Figura 2.10.** Curvas de calibrado de los compuestos de la ruta 4S en fase acuosa analizados a 239nm (a, b y c) y 210 nm (d).



**Figura 2.11.** Curvas de calibrado de los derivados alquilados (4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT) y DBT a 239 nm en fase acuosa.

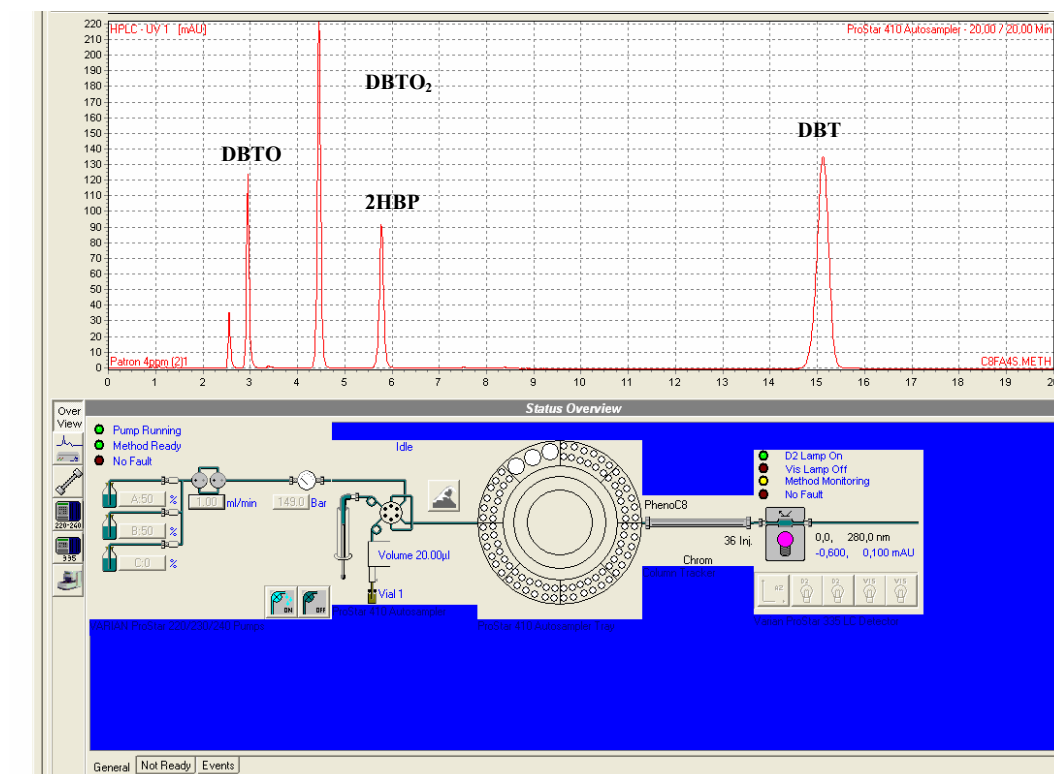
Los valores correspondientes a las curvas de calibrado de todos los compuestos analizados en fase acuosa, se muestran en la tabla 2.9.

Compuesto	Ecuación
DBTO	$= 3.130 \cdot 10^5 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}^*$
DBTO <sub>2</sub>	$= 8.011 \cdot 10^5 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
DBT	$= 1.343 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
HBP	$= 1.291 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
4MDBT	$= 1.108 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
4,6DMDBT	$= 1.261 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
4,6DEDBT	$= 1.609 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$

\* *mili unidades de absorbancia por minuto.*

**Tabla 2.9. Curvas de calibrado de todos los compuestos analizados en fase acuosa.**

En la figura 2.12 se muestra el cromatograma obtenido por HPLC-DAD correspondiente a los compuestos DBT, DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBP analizados en fase acuosa, medidos a 239 nm.



**Figura 2.12. Cromatograma obtenido por HPLC-DAD de la fase orgánica a 239 nm.**

### 2.6.2.2. Análisis de la fase orgánica.

Se utilizó una columna C18 Kromasil de Supercosil, de dimensiones 150 x 4.60 mm de 5  $\mu$ m de diámetro interno. Se han desarrollado dos métodos, en función de los compuestos a analizar. Para analizar los compuestos DBT, DBTO, DBTO2 y HBP, se trabaja con una fase móvil compuesta por 55 % acetonitrilo y 45 % agua, con un flujo de 1 mL/min, y la detección se llevó a cabo a 278 nm.

Para el análisis de los derivados alquilados (4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT) y DBT, se trabaja con una fase móvil compuesta por 80 % acetonitrilo y 20% de agua, con un flujo de mL/min, y la detección se llevó a cabo a 278 nm. En ambos casos, el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L.

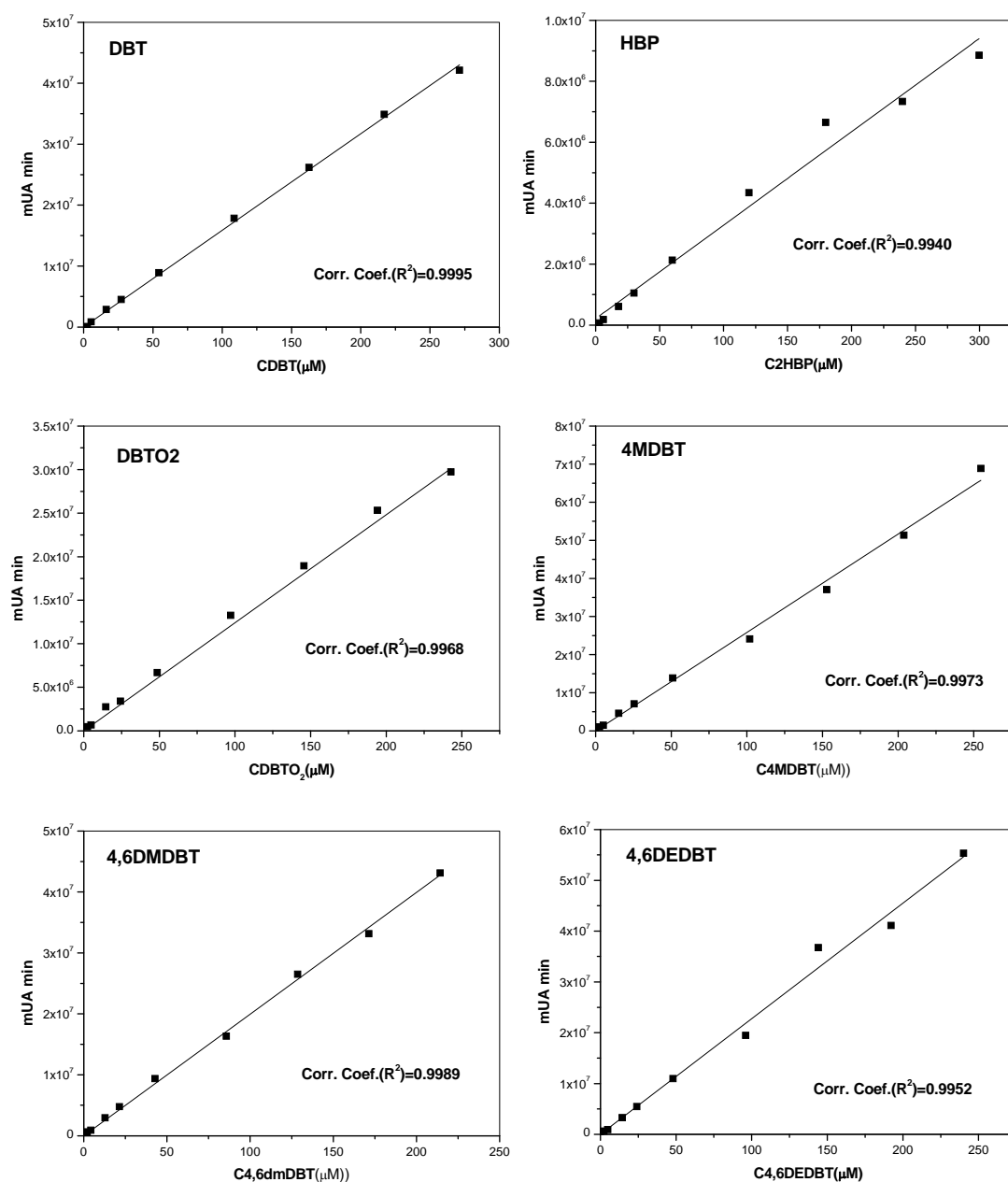
En la tabla 2.10 se muestra los valores de la curvas de calibrado obtenida para los compuestos DBT, DBTO2 y HBP medidos en fase orgánica, así como los compuestos Cx-DBT (4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT) empleados en este trabajo. De la misma manera, en la figuras 2.13 y 2.14 se muestra la representación gráfica de las curvas de calibrado para los compuestos determinados en fase orgánica.

Compuesto	Ecuación
DBTO2	$= 1.193 \cdot 10^5 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}^*$
DBT	$= 1.586 \cdot 10^5 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
HBP	$= 1.240 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
4MDBT	$= 2.581 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
4,6DMDBT	$= 1.995 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$
4,6DEDBT	$= 2.275 \cdot 10^6 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}$

\* mili unidades de absorbancia por minuto.

Tabla 2.10. Curvas de calibrado de todos los compuestos analizados en fase orgánica.

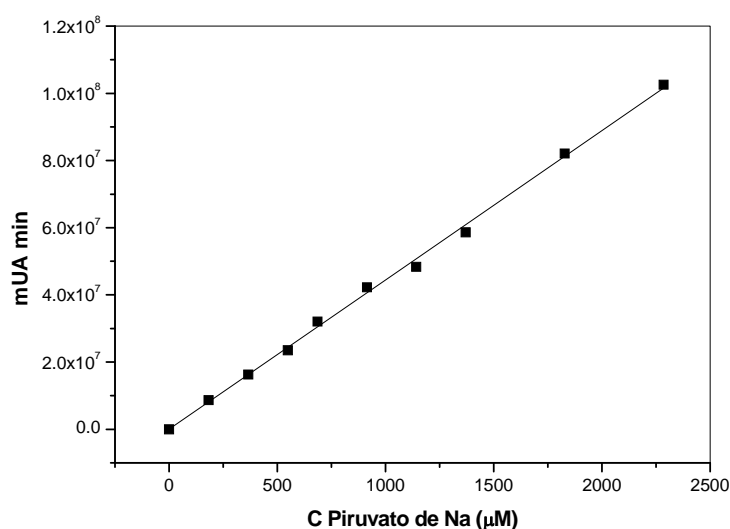




**Figura 2.13.** Curvas de calibrado de los intermedios de la ruta 4S (DBTO<sub>2</sub> y 2HBP) y de los derivados alquilados (4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT) y DBT a 278 nm en fase orgánica.

### **2.6.2.3. Análisis de los intermedios del ciclo de Krebs.**

Se utilizó una columna C18 Sinergi HIDRO-RP, de dimensiones 250 x 4.60 mm de 4 µm de diámetro interno. Para analizar el piruvato, citrato y succinato, se trabaja con una fase móvil compuesta por 0.02mM de tampón fosfato a pH 3, con un flujo de 0.6 mL/min, y la detección se llevó a cabo a 210 nm, y un volumen de inyección de 60 µL. La curva de calibrado correspondiente para piruvato se muestra en la figura 2.14.



**Figura 2.14. Curva de calibrado de piruvato de sodio a 239 nm en tampón fosfato.**

La curva de calibrado para el piruvato de sodio queda descrita por la siguiente ecuación:

$$C (\mu\text{M}) = 4.444 \cdot 10^4 \cdot \text{mUA} \cdot \text{min}^* \quad r^2=0.9919 \quad (2.6)$$

\* mili unidades de absorbancia por minuto.

### **2.6.3. Análisis cinético del crecimiento y de la biodesulfuración.**

Se han llevado a cabo dos tipos de análisis, uno para describir el crecimiento y otro para describir el proceso de biodesulfuración.

El estudio del crecimiento bacteriano en los distintos tipos de reactores de tamaño y configuración, se ha desarrollado mediante la ecuación logística, ajustando

por regresión no lineal, empleando el programa Origin 8.0, y posteriormente se ha realizado la simulación de los datos experimentales utilizando el programa MAPLE 10.

El proceso de biodesulfuración, desarrollado en condiciones de *resting cell*, se ha descrito con ecuaciones basadas en el modelo cinético enzimático de Michaelis Menten, para los ensayos realizados en fase acuosa, tanto a escala de agitador orbital como a escala de tanque agitado. Los parámetros cinéticos encontrados en la bibliografía se han adaptado a nuestros biocatalizadores y condiciones experimentales para, mediante la integración y la generación de curvas concentración-tiempo con el programa MAPLE 10, simular correctamente los datos obtenidos en la experimentación.

En otros casos ha sido necesario calcular dichos parámetros intrínsecos, debido a que no se encontraban reportados. Para calcular los parámetros de los modelos cinéticos propuestos, se ha utilizado el método integral en forma de velocidades de producción o desaparición, según el caso, ya que los datos obtenidos experimentalmente son integrales, y además el error que acompaña al método diferencial con este tipo de datos es considerable (García-Ochoa y col., 1993).

La cinética del proceso de desulfuración realizado en condiciones bifásicas en *resting cell* a escala de agitador orbital y tanque agitado, ha sido descrita en todos los casos, con la obtención de las correspondientes constantes cinéticas aparentes, ya que no se ha podido ajustar a la ecuación de Michaelis Menten, utilizándose el método integral para su obtención. Posteriormente, utilizando el programa Maple 10, se han simulado los datos experimentales obtenidos de forma satisfactoria.

## **CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE *Pseudomonas Putida* CECT5279 Y SU ESCALADO**

<b>3.1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	85
<b>3.3. MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO</b> .....	91
<b>3.3. CONSUMO Y TRANSPORTE DE OXÍGENO</b> .....	94
<b>3.3.1. Medida del consumo de oxígeno</b> .....	95
<b>3.3.2. Medida del transporte de oxígeno</b> .....	99
<b>3.4. RESULTADOS EXPERIMENTALES</b> .....	105
<b>3.4.1. Estudio del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en biorreactor tipo <i>air-lift</i></b> .....	107
<b>3.4.2. Comparación del proceso de producción de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en distintas configuraciones de biorreactor</b> .....	113
<b>3.4.3. Estudio del consumo y transporte de oxígeno en el crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en <i>air-lift</i></b> .....	118
<b>3.4.4. Escalado de la producción del biocatalizador</b> .....	124
<b>3.4.4.1. Estudio de <math>k_L a</math> en tanque agitado de 15L de volumen</b> .....	131
<b>3.4.4.2. Proceso de escalado de <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279</b> .....	133

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

En este capítulo se presenta el estudio de la obtención del biocatalizador *Pseudomonas putida* CECT5279 en distintas configuraciones y escalas de biorreactores. Posteriormente, para la desulfuración de DBT y sus derivados alquilados, utilizando *resting-cell* como forma de operación, a escala de agitador orbital y de tanque agitado.

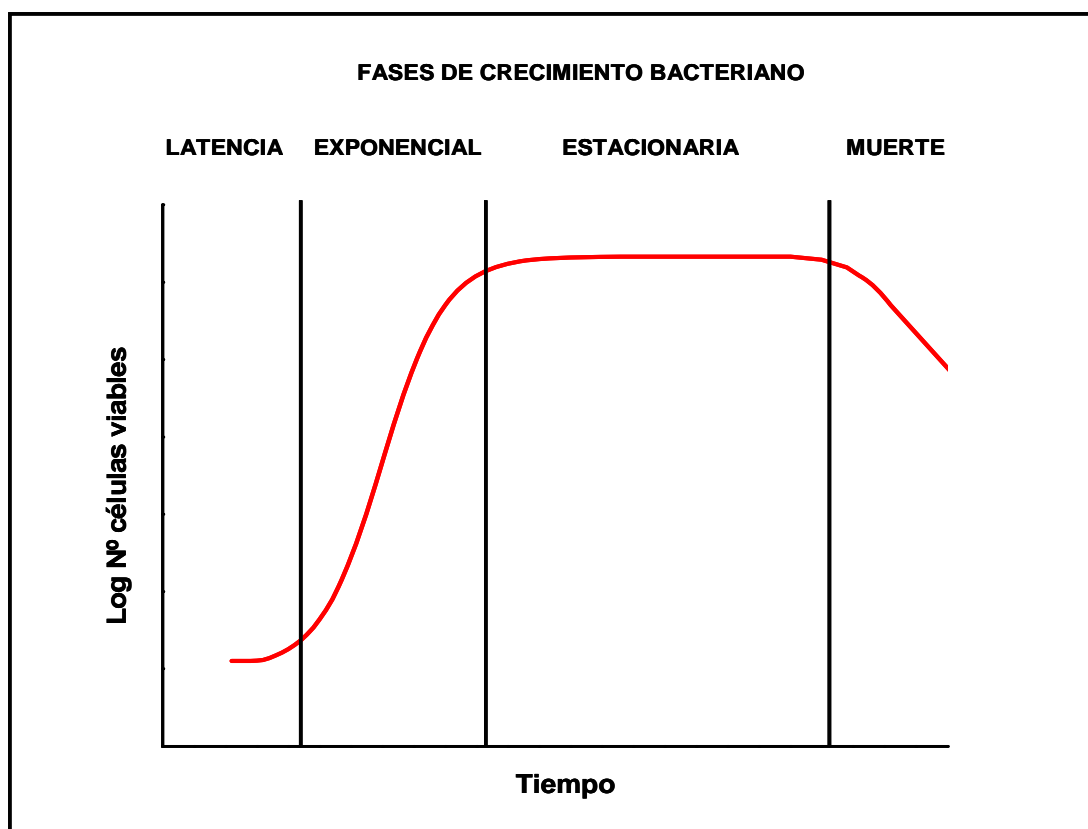
La etapa de crecimiento es muy importante debido a que su optimización permite obtener grandes cantidades de biocatalizador con la mayor capacidad desulfurante en el menor tiempo posible. En este trabajo se ha estudiado de forma conjunta el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 en distintas configuraciones de biorreactores (tanque agitado y *air-lift*) y la capacidad desulfurante a distintas edades de crecimiento, para de ese modo determinar las mejores condiciones de producción del biocatalizador en cada uno de ellos.

Por otro lado, para conseguir una cantidad de células suficiente para realizar los ensayos de biodesulfuración en *resting cell* a nivel de tanque agitado, ha sido necesario realizar el escalado del proceso de crecimiento, utilizando biorreactores de mayor volumen, de forma que no se altere la capacidad desulfurante del microorganismo. Previamente a la realización del proceso de escalado, ha sido necesario realizar un estudio de las condiciones hidrodinámicas del biorreactor, para así determinar las condiciones de operación óptimas relacionadas con la velocidad de agitación y aireación. Estas serán las variables más importantes necesarias para realizar el proceso de escalado con éxito, ya que determinan la tasa de oxígeno suministrada a lo largo del proceso.

En el caso de que los microorganismos se cultiven en un medio líquido, en un sistema cerrado o de forma discontinua, al cual no se le proporciona ninguna cantidad suplementaria a la inicial, las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de residuos aumentan.

Cada célula individual se va a reproducir por un proceso llamado fisión binaria, en el cual el tiempo que requiere cada ciclo de crecimiento es muy variable y depende de factores nutricionales y genéticos. De forma general, el crecimiento bacteriano puede describirse a través de cuatro fases distintas. La primera etapa recibe el nombre de *fase de latencia*, que corresponde al período de tiempo en el que las células se adaptan a las nuevas condiciones medioambientales. Este período puede tener una duración variable dependiendo del microorganismo, pero normalmente no se produce un aumento inmediato del número de células o de biomasa, por lo que la velocidad de crecimiento en esta fase es muy baja o casi nula.

Una vez que las células se han adaptado a las nuevas condiciones del medio, se presenta la *fase de crecimiento exponencial*. Durante la fase exponencial o logarítmica, los microorganismos crecen y se dividen hasta el máximo posible, en función de su potencial genético, del tipo de medio y de las condiciones ambientales en las que crecen.



**Figura 3.1. Curva típica de crecimiento bacteriano.**

En un cultivo realizado en discontinuo, en el cual no existe aporte de nutrientes suplementario al medio, este se va empobreciendo de nutrientes esenciales o bien algún producto resultante del metabolismo microbiano se acumulará y alcanzará concentraciones tóxicas o inhibitorias por lo que frenará el crecimiento exponencial.

Cuando esto sucede se dice que se ha alcanzado la *fase estacionaria*, en ella el número de total de microorganismos viables permanece constante, por lo que la velocidad de crecimiento disminuye de manera importante, alcanzándose un equilibrio debido a que algunas células comienzan a morir. A pesar de que no hay un crecimiento neto en esta fase la mayoría de las funciones celulares continúa.

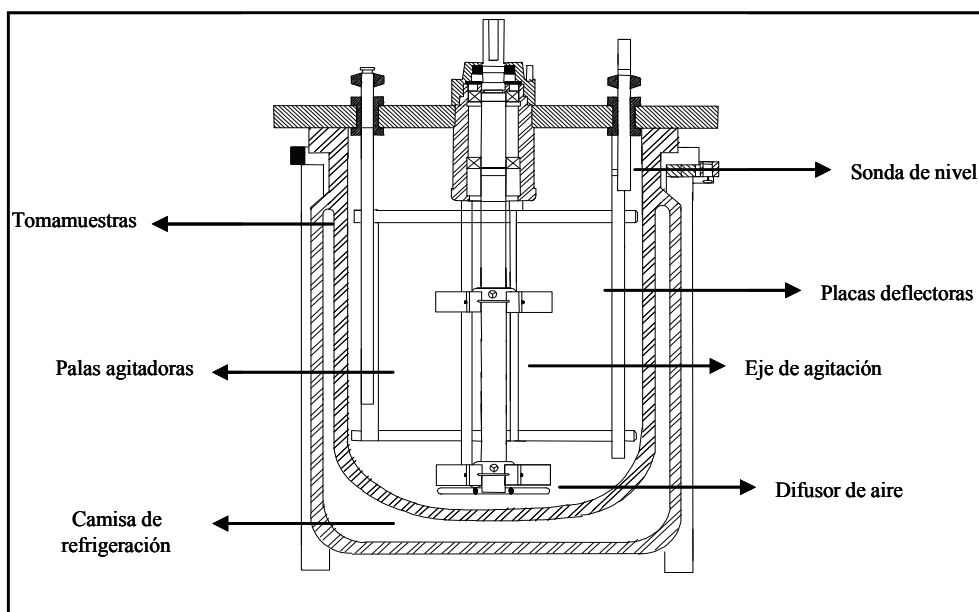
Cambios ambientales perjudiciales, como la privación de nutrientes o acumulación de residuos tóxicos originan la disminución del número de células viables, hecho que caracteriza la *fase de muerte*. La muerte de una población microbiana, al igual que la fase de crecimiento presenta un comportamiento exponencial (esto es que una cantidad constante de células mueren por unidad de tiempo).

Dado que el microorganismo utilizado en este trabajo se produce siempre en discontinuo, este es el modelo utilizado para describir el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 en el medio BSM, excluyéndose la fase de muerte celular.

De forma general, para la realización de cultivos de grandes cantidades de microorganismos, es necesario el uso de tanques conocidos como fermentadores o biorreactores. Entre ellos, los reactores utilizados en cultivos anaerobios, sin inyección de aire ni agitación (son generalmente de construcción más simple) mientras que para las fermentaciones aerobias, las características de mayor importancia en el diseño del reactor recaen en la provisión de un mezclado y aireación adecuada. En este capítulo se van a considerar las configuraciones correspondientes a biorreactores que operan aeróbicamente, los más representativos se muestran a continuación (Bailey y Ollas, 1986; Doran, 1998):

-*Tanques agitados y aireados*. Se trata del biorreactor más utilizado y es aquel que en el proceso de fermentación aerobio dispone de un sistema de aireación y de mezclado del cultivo. El reactor de tipo tanque agitado con agitación convencional, incluye un sistema de agitación mecánico consistente en un eje vertical con varios agitadores, el cual además dispone de varios deflectores, generalmente entre 4 y 6, y cuya anchura representa un 10% del diámetro de la vasija, de modo que se localizan a lo largo del perímetro del reactor con el objeto de fomentar la turbulencia. Este tipo de fermentadores se usa habitualmente para procesos con enzimas libres e inmovilizadas, así como para el cultivo de células en suspensión o inmovilizadas.

La desventaja que presenta este biorreactor esta relacionada con el incremento del volumen de cultivo., debido a que aparecen problemas en el escalado, tales como el incremento del estrés mecánico por la agitación del impulsor, incremento en la producción de espumas y transporte de las células al interior del biorreactor. Por otra parte, es necesario tener una cuidado especial cuando se utilizan determinados biocatalizadores, ya que estos pueden ser dañados o destruidos por la acción de las palas impulsoras.



**Figura 3.2. Sección transversal de un biorreactor tipo tanque agitado.**



- *Columna de burbujeo*. Una alternativa al tanque agitado la constituyen aquellos reactores sin agitación mecánica. El fermentador de columna o torre de burbujeo es el fermentador más sencillo. Está formado por un recipiente cilíndrico generalmente con alturas superiores al doble de su diámetro, provisto de un mecanismo de dispersión de gas en el fondo como única estructura interna, el cual le provee al sistema de la aireación y la mezcla deseadas con menos consumo de energía que la agitación mecánica. Las burbujas de aire o de oxígeno a medida que ascienden mezclan el contenido del reactor y satisfacen la demanda de oxígeno de las células.

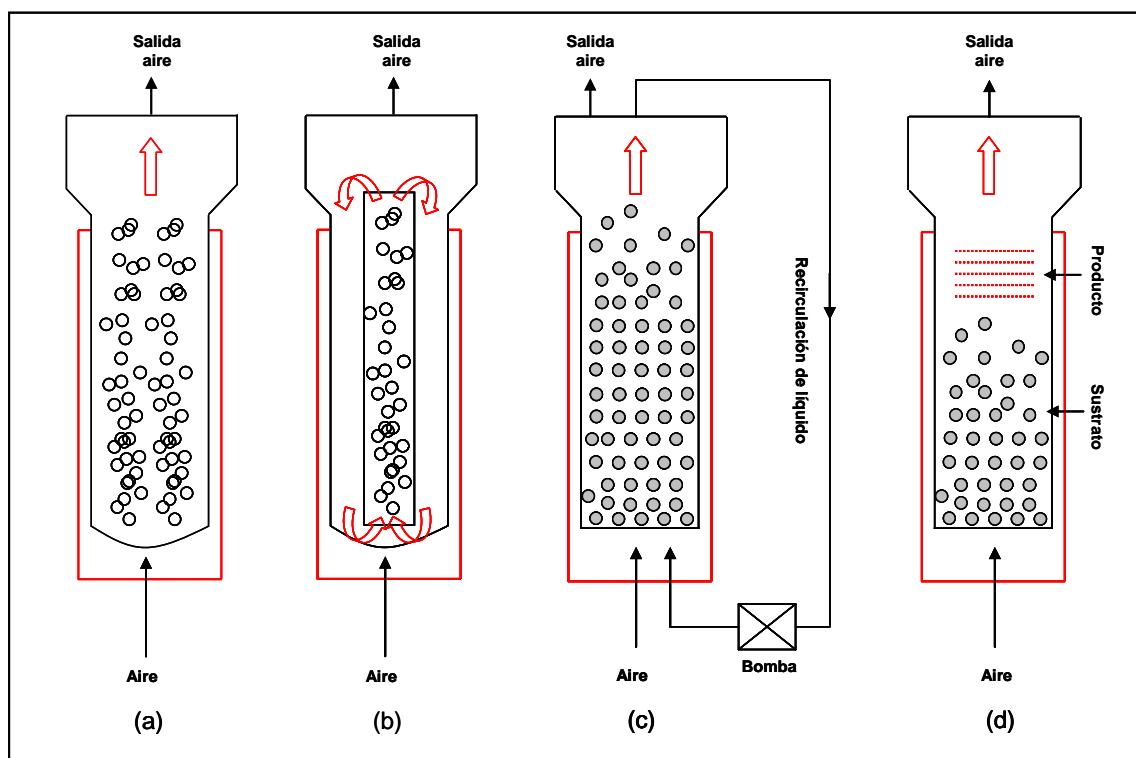
-*Reactor air-lift*. Al igual que las columnas de burbujeo, en los reactores *air-lift* la mezcla se produce sin agitación mecánica. Se utilizan a menudo para cultivos de células animales y vegetales, así como para biocatalizadores inmovilizados, debido a que presentan menores niveles de cizalla que los tanques agitados.

Existen diversos tipos de reactores *air-lift*, sin embargo el rasgo característico que los diferencian de los de columna de burbujeo es que las corrientes de flujo de líquido están más definidas debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes, debido a su peculiar estructura formada por un deflector interior o tubo *draft*. Se emplean en la producción de proteínas de origen unicelular, tratamiento de aguas residuales, así como para el crecimiento de microorganismos sensibles al estrés producido por la agitación mecánica.

-*Reactor de lecho fijo*. Este tipo de reactores se utiliza con biocatalizadores inmovilizados o en forma de partículas. El reactor consiste en un tubo generalmente vertical, relleno o empacado con partículas de catalizador. El medio de cultivo puede alimentarse por la parte superior o inferior de la columna y forma una fase líquida continua entre las partículas. En los lechos empaquetados, el daño debido al desgaste de las partículas es mínimo en comparación con los reactores agitados. Se emplean a nivel comercial con células y enzimas inmovilizadas para la producción de aspartato y fumarato, y en la separación de isómeros de aminoácidos.

-*Lechos fluidizados*. Son aquellos reactores en los cuales se hace fluir un líquido sobre un lecho empaquetado de partículas de catalizador de tamaño y densidad apropiados, el cual se expande debido al movimiento ascendente del líquido.

Los reactores de lecho fluidizado se utilizan en el tratamiento de residuos con arena, que soporta la mezcla de poblaciones bacterianas. También pueden utilizarse con microorganismos floculantes en los procesos de fabricación de cerveza o vinagre.



**Figura 3.3. Esquema de los biorreactores: (a) Columna de burbujeo, (b) Airlift, (c) Reactor de lecho fijo con recirculación y (d) Reactor de lecho fluidizado.**

El objetivo de este capítulo es realizar el estudio cinético del crecimiento y su influencia en la capacidad desulfurante en dos configuraciones de biorreactor. Los crecimientos bacterianos realizados en este trabajo, se han llevado a cabo utilizando biorreactores tipo tanque agitado y tipo *air-lift* de 2L de capacidad, siendo los más utilizados en los bioprocesos más habituales, como pueden ser fermentaciones aerobias y tratamientos biológicos de aguas residuales.

Por otro lado se pretende realizar el proceso de escalado de la producción de la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 en reactor tipo tanque agitado a escala de planta piloto, utilizando un biorreactor de 15L, teniendo en cuenta no sólo la cantidad de biomasa producida, sino también estudiando la capacidad desulfurante a distintas edades de crecimiento y en distintas condiciones de transferencia de oxígeno durante el crecimiento.

### **3.2. MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO**

El modelo cinético empírico propuesto para describir el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 en un cultivo discontinuo considerando una célula microbiana media representativa de toda la población; está basado en la ecuación logística propuesta por Verhurst en 1844 y Peral y Reed en 1920 (Bailey y Ollas, 1983) y que ha sido utilizada en diversa ocasiones para diferentes sistemas (Pinches y Pallent, 1986; Weiss y Ollas, 1980).

En el modelo cinético utilizado, la biomasa está representada por el conjunto de células que conviven simultáneamente en el medio, las cuales se encuentran en distintas etapas del ciclo celular. Por tanto, la medida de biomasa se ha de entender como un microorganismo medio entre todas las células que componen el cultivo. Para cuantificar la cantidad de biomasa que hay en el cultivo a lo largo del crecimiento, se utiliza la concentración de biomasa ( $C_x$ ), y cuya evolución con el tiempo, se ha podido describir utilizando una ecuación que sigue el modelo logístico.

Para desarrollar el modelo cinético puede utilizarse el modelo de Malthu's, basado en la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (3.1)$$

Donde se  $C_x$  es la concentración de biomasa,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y  $t$  es el tiempo. Este modelo puede predecir un crecimiento ilimitado en el tiempo, pero que sin embargo no se va a producir. Por esa razón, se ha propuesto un

término de inhibición para proporcionar una limitación al crecimiento el cual va a depender de la concentración celular, considerando que existe un sustrato limitante del crecimiento bacteriano:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_s C_s \quad (3.2)$$

Donde  $C_s$  es la concentración de sustrato, y  $k_s$  la constante de desaparición de sustrato. El sustrato consumido a lo largo del crecimiento puede representarse por un coeficiente de conversión,  $Y_{x/s}$ , representado por la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta C_x}{\Delta C_s} = -\frac{C_x - C_{x_0}}{C_s - C_{s_0}} \quad (3.3)$$

En dicha ecuación,  $C_{x_0}$  es la concentración de inóculo de microorganismo y  $C_{s_0}$  es la concentración de sustrato inicial. Reorganizando la ecuación 3.3 se obtiene:

$$C_s = \frac{C_{x_0} + Y_{x/s} C_{s_0} - C_x}{Y_{x/s}} \quad (3.4)$$

Al ser S el sustrato limitante del crecimiento, cuando  $C_s=0$  y  $C_x= C_x^{\max}$ , resulta:

$$C_x^{\max} = C_{x_0} + Y_{x/s} C_{s_0} \quad (3.5)$$

Introduciendo la ecuación 3.5 en la ecuación 3.4, se obtiene:

$$C_s = \frac{C_x^{\max} - C_x}{Y_{x/s}} = \frac{C_x^{\max}}{Y_{x/s}} \left( 1 - \frac{C_x}{C_x^{\max}} \right) \quad (3.6)$$

Aplicando la regla de la cadena en el término de la parte derecha de la ecuación 3.2, se obtiene:

$$\frac{dC_s}{dC_x} \frac{dC_x}{dt} = -k_s C_s \quad (3.7)$$

Si posteriormente se sustituye el coeficiente de conversión  $Y_{x/s}$  en la ecuación 3.7:

$$\frac{dCx}{dt} = k_s Y_{x/s} C_s \quad (3.8)$$

Luego si se sustituye el valor de  $C_s$  dado por la ecuación 3.6 en la ecuación 3.8, se obtiene la expresión:

$$\frac{dCx}{dt} = k_s C_x^{\max} \left( 1 - \frac{Cx}{C_x^{\max}} \right) \quad (3.9)$$

La ecuación 3.9 contribuye a postular un modelo el cual está afectado por un factor de inhibición que afecta al crecimiento del microorganismo. Asumiendo que la inhibición posee una cinética de segundo orden respecto a la concentración de biomasa, la ecuación 3.9 se modifica quedando la siguiente expresión:

$$\frac{dCx}{dt} = \mu_{\max} Cx \left( 1 - \frac{Cx}{C_x^{\max}} \right) \quad (3.10)$$

Por lo tanto, los parámetros cinéticos de este modelo de crecimiento son  $\mu_{\max}$  (velocidad específica de crecimiento) y  $C_x^{\max}$  (concentración máxima de biomasa). El primero,  $\mu_{\max}$ , está relacionado con el tiempo de duplicación de las células en la fase exponencial de crecimiento, y es característico de cada cepa bacteriana, en un medio de cultivo y con unas condiciones de crecimiento determinadas. El segundo parámetro  $C_x^{\max}$ , presenta la máxima concentración de biomasa que se alcanza en la fase estacionaria de la curva de crecimiento, y también es característico de la cepa bacteriana, del medio y de las condiciones de operación utilizadas durante el crecimiento.

La ecuación 3.10 es fácilmente integrable obteniéndose la ecuación logística:

$$Cx = \frac{Cx_0 e^{\mu_{\max} t}}{1 - (Cx_0 / C_x^{\max})(1 - e^{\mu_{\max} t})} \quad (3.11)$$

Por otro lado, la capacidad desulfurante desarrollada por la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 se ha considerado como una propiedad asociada al crecimiento bacteriano, de modo que se ha procedido a su determinación, estudiándose su evolución con la producción de biomasa y edad de crecimiento, en cada configuración y tamaño de biorreactor.

### **3.3. CONSUMO Y TRANSPORTE DE OXÍGENO**

El crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 realizado en cualquier tipo y escala de biorreactor, se encuentra influenciado por el suministro de oxígeno y por su transporte a lo largo de la fase líquida durante el crecimiento. Debido a la baja solubilidad del oxígeno en la fase líquida, es necesario suministrar oxígeno de manera continua al sistema, al medio y al microorganismo, lo que convierte a estos sistemas en heterogéneos, formados por tres fases: gas-líquido-sólido.

La producción de este biocatalizador con una alta capacidad desulfurante y un rendimiento de biomasa elevado, no solo va a depender de la composición del medio y de las condiciones de operación (pH, temperatura, agitación, etc), sino también del transporte y consumo de oxígeno de la bacteria.

Por tanto, el estudio del consumo y transporte de oxígeno es fundamental en el proceso de producción del biocatalizador. La bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 es una bacteria aerobia estricta que necesita oxígeno para crecer y mantenerse, por lo que la disponibilidad de oxígeno en el medio de crecimiento es de vital importancia ya que afecta al metabolismo celular. El consumo de oxígeno por parte de la bacteria quedaran descritas a través del coeficiente volumétrico de transferencia de materia,  $K_L a$  y la velocidad de consumo de oxígeno (OUR: *Oxygen Uptake Rate*).

La transferencia de oxígeno en el proceso fermentativo está fuertemente influenciada por las condiciones hidrodinámicas en el biorreactor, las cuales variarán en función de las propiedades físico-químicas del medio de crecimiento, los parámetros geométricos del biorreactor, y además del oxígeno consumido por el microorganismo.

Por esta razón, en las distintas configuraciones de biorreactores utilizados, tipo tanque agitado y *air-lift*, los parámetros del modelo cinético de crecimiento ( $\mu_{\max}$  y  $C_x^{\max}$ ) se ven afectados de manera notable debido a que estos poseen diferentes mecanismos de dispersión de aire, afectando principalmente al coeficiente volumétrico de transferencia de materia.

En el caso de bioreactores tipo tanque agitado, este proporciona una excelente mezcla del medio y por tanto una elevada transferencia de masa. En este tipo de sistemas, la transferencia de masa está afectada por un elevado número de variables, que también afectan a la mezcla. Sin embargo, las variables más importantes son la velocidad de agitación, tipo y número de agitadores, así como el flujo de aire utilizado.

Los biorreactores tipo *air-lift* o columna de burbujeo, permiten el cultivo de microorganismos sensibles al daño celular producido por la agitación mecánica, controlándose la agitación a través del suministro de flujo de oxígeno.

### ***3.3.1. Medida del consumo de oxígeno***

El método más utilizado para determinar la velocidad de consumo y de transporte, es el método dinámico clásico, debido principalmente a su sencillez y exactitud (Dussap y Gros, 1985; Yang y col., 1988; Gao y Lee, 1992; Rane y Sims, 1994; Gómez, 1995; García Ochoa y col., 2000; Gómez y col., 2006; García Ochoa y col., 2009).

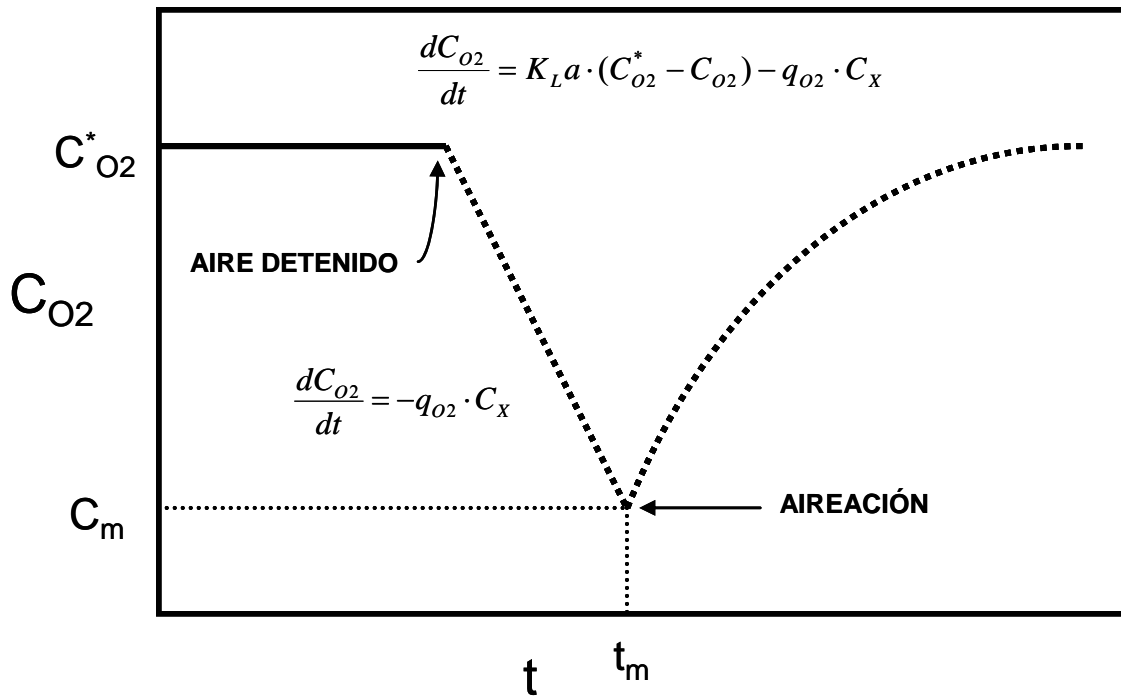
El *método dinámico clásico* está basado en el balance de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación, el cual se representa por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_x \quad (3.12)$$

En esta ecuación pueden diferenciarse dos términos. El primer término le corresponde al transporte de oxígeno, siendo  $K_L a$  el coeficiente volumétrico de

transferencia de materia,  $C_{O_2}^*$  es la concentración de saturación de oxígeno disuelto y  $C_{O_2}$  la concentración de oxígeno en cada momento. El segundo término le corresponde al consumo de oxígeno realizado por el microorganismo, siendo  $q_{O_2}$  la velocidad específica de consumo de oxígeno y  $C_X$  la concentración de biomasa en cada momento.

Para la determinación experimental del consumo de oxígeno por parte del microorganismo, es necesario aplicar un ciclo de desorción-absorción (Fig. 3.4).



**Figura 3.4.** Esquema de la aplicación del método dinámico clásico para medir el consumo de oxígeno y el coeficiente volumétrico de transferencia de materia ( $K_La$ ) con biotransformación.

Este método requiere de la interrupción del flujo aire, en la cual el primer término de la ecuación (3.12) se hace cero. De forma simultanea, se mide la concentración de biomasa en el medio para determinar así el consumo específico de oxígeno por parte del microorganismo ( $q_{O_2}$ ), pudiendo obtenerse la velocidad de consumo como la pendiente, de signo negativo, de la recta de regresión obtenida al representar la concentración de oxígeno disuelto frente al tiempo durante la etapa de desorción, por lo que la ecuación (3.12) queda reducida a la siguiente expresión:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -q_{O_2} \cdot C_X = -OUR \quad (3.13)$$

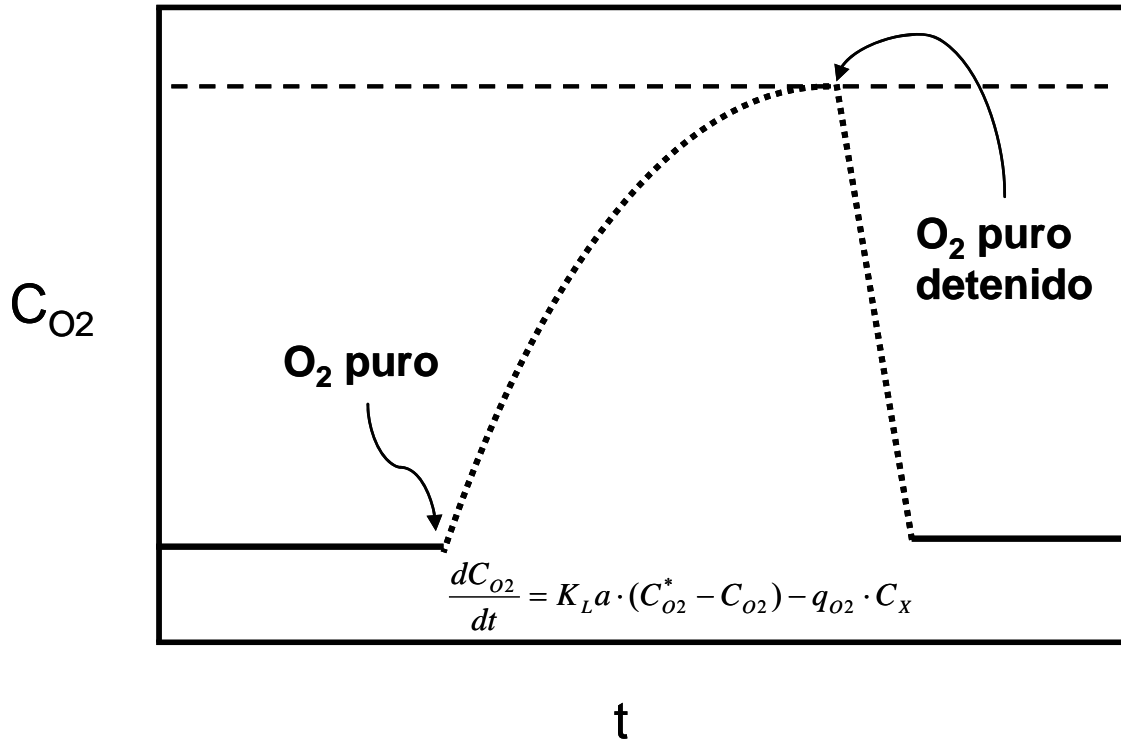


La bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 presenta un comportamiento que no ha sido observado en otros microorganismos a lo largo del proceso de crecimiento. En un crecimiento bacteriano típico realizado en discontinuo, la concentración de oxígeno disuelto disminuye de forma gradual a lo largo del tiempo de fermentación, hasta que el microorganismo alcanza la fase estacionaria y la concentración de oxígeno disuelto vuelve a aumentar. Esta evolución se ha habitualmente en muchos tipos de bacterias, levaduras y hongos.

Sin embargo, de forma independiente al biorreactor utilizado para el cultivo de *Pseudomonas putida* CECT5279, la concentración de oxígeno disuelto disminuye de manera acusada en pocos minutos, acercándose a cero y manteniéndose hasta que el microorganismo alcanza la fase estacionaria, en la cual tampoco se modifica. Bajo estas condiciones no es posible determinar el valor de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), y del coeficiente volumétrico de transferencia de materia durante la fermentación utilizando el método dinámico clásico. Debido a esta razón ha sido necesario utilizar una modificación del *método dinámico clásico*.

Dicha modificación consiste en la introducción de oxígeno puro en el bioreactor en lugar de cortar el suministro de aire (Figura 3.5). Comenzando a una concentración determinada de oxígeno ( $C_0$ ) para un tiempo  $t=0$ , se suministra oxígeno puro al interior del reactor (etapa de absorción), de modo que se produce un cambio de la composición de gas en la entrada que produce un cambio en la fuerza impulsora ( $C_{O_2}^* - C_{O_2}$ ).

Posteriormente, una vez alcanzada la saturación de oxígeno puro del medio, se detiene su suministro, produciéndose una disminución progresiva de la concentración de oxígeno disuelto hasta recuperar los niveles iniciales. En todo momento se registra la evolución de la concentración de oxígeno disuelto a diferentes tiempos de crecimiento, y esta permite la obtención de los valores de OUR y  $K_{La}$  para cada concentración de biomasa o tiempo de crecimiento. La velocidad específica de consumo de oxígeno puede determinarse como la pendiente de signo negativo, de la recta de regresión obtenida al representar la velocidad de consumo de oxígeno disuelto frente a la concentración de biocatalizador durante la etapa de no aireación, según la ecuación 3.13.



**Figura 3.5.** Esquema de la aplicación del método dinámico modificado para medir el consumo de oxígeno y el coeficiente volumétrico de transferencia de materia ( $K_L a$ ) con biotransformación, en el escalón de aire-oxígeno puro- microorganismo.

Por otro lado, Pinches y Pallent (1986) consideran que el microorganismo consume oxígeno para dos fines: el mantenimiento de la viabilidad celular (representado por el coeficiente de mantenimiento  $m_{O_2}$ ) y el crecimiento (considerando un rendimiento macroscópico,  $Y_{O_X}$ ). Estos autores proponen la siguiente ecuación para describir la velocidad de consumo de oxígeno en transformaciones microbianas:

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_x = m_{O_2} C_x + Y_{O_X} \frac{dC_x}{dt} \quad (3.14)$$

El parámetro  $m_{O_2}$  tiene un valor constante independiente de las condiciones de transporte de oxígeno que existan en el medio de crecimiento, mientras que el parámetro  $Y_{O_X}$  puede verse influenciado por el transporte, por lo que tendrá un valor distinto en cada caso que cambien las condiciones de operación en el medio de cultivo (García-Ochoa y col., 2000; Olmo y col, 2005; Gómez y col., 2006).

Si se considera el modelo cinético de crecimiento para este microorganismo, sustituyendo la ecuación 3.10 en la ecuación 3.14, el valor de OUR quedará descrito por la siguiente ecuación:

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_X = m_{O_2} C_X + Y_{OX} \mu_{\max} C_X \left( 1 - \frac{C_X}{C_{X \max}} \right) \quad (3.15)$$

### ***3.3.2. Medida del transporte de oxígeno***

Las células desarrolladas en cultivos aerobios toman el oxígeno del líquido, por lo que la velocidad de transferencia del oxígeno del gas al líquido es de vital importancia, la cual se verá afectada por la variación de la densidad celular a lo largo del crecimiento y a la limitación producida por la baja disponibilidad de oxígeno en el medio.

La velocidad de transporte de materia se representa como el cociente entre la fuerza impulsora, el gradiente de concentración, y una resistencia al transporte,  $1/k_L a$ , siendo  $k_L a$  el coeficiente volumétrico de transferencia de materia. Conocer este coeficiente es indispensable para realizar el diseño de bioreactores, así como en el cambio de escala del proceso microbiano aunque, en muchos casos, pueda resultar complejo en el caso de que se trate de sistemas microbianos que requieran un elevado consumo de oxígeno, como es este caso.

De forma general, existen dos formas de calcular  $k_L$  y  $a$ , bien mediante correlaciones empíricas o bien mediante medidas experimentales. En ambos casos, la determinación por separado de  $k_L$  y  $a$  es laborioso y algunas veces imposible. Es conveniente por tanto, calcular el valor conjunto de  $k_L a$ .

Debido a la dificultad existente para predecir el valor de  $k_L a$  en biorreactores mediante correlaciones existentes, los coeficientes de transferencia de materia para el oxígeno se determinan de manera experimental. En cualquier método que se utilice para medir  $k_L a$ , las condiciones de medida deben de ser lo más similares posibles a las existentes en el fermentador durante la operación. En este trabajo se han empleado dos

técnicas de medida, en función de si se realizan en ausencia o presencia de biotransformación. La técnica de medida indirecta, por la cual se obtiene el valor de  $k_La$ , se utiliza en caso de la ausencia de biocatalizador, y con el uso de la técnica de medida directa, se obtiene el valor de  $k_La$ , en presencia del mismo.

***- Técnicas de medida de  $k_La$  en condiciones inertes***

Este tipo de técnicas se llevan a cabo en medios de fermentación en ausencia de microorganismos. Los valores de  $k_La$  obtenidos en este tipo de sistemas, en los cuales no se está produciendo biotransformación se emplean habitualmente para comparar diferentes tipos de biorreactores que operan en condiciones similares o bien para la obtención de correlaciones empíricas que van a permitir la estimación de el coeficiente de transporte y de ese modo describir la transferencia de materia gas-líquido (Dussap y col., 1985; Vlaev y Valeva, 1990; Yasukawa y col., 1991a y b; Leckie y col., 1991; Garcia-Ochoa y col., 1998; Gomez y col., 2006; García-Ochoa y col., 2009).

Al no existir transformación microbiana, el término correspondiente al consumo de oxígeno por parte del microorganismo se hace cero en la ecuación (3.8), de modo ecuación quedaría del siguiente modo:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_La \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (3.16)$$

De modo, que integrando la ecuación 3.12, se obtiene la ecuación 3.13, pudiendo obtenerse el valor de  $k_La$  para el sistema en ausencia de microorganismo, como la pendiente de la recta de regresión obtenida de representar el término  $Ln\left(1 - \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^*}\right)$  frente al tiempo:

$$Ln\left(1 - \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^*}\right) = -k_La \cdot t \quad (3.17)$$

Los métodos de medida de la concentración de oxígeno en biorreactores más usados son los métodos químicos. Los métodos químicos se basan en la medida de la

concentración de oxígeno disuelto en un líquido a través de una reacción química. La técnica clásica es la oxidación del sulfito sódico en la presencia de un catalizador como es  $\text{Cu}^{2+}$  (Yoshida y col., 1960; Dussap y col., 1985; Yang y col., 1992). Aunque el método del sulfito ha sido utilizado ampliamente, los resultados parecen depender de las condiciones de operación de manera imprevisible y generalmente da valores de  $k_L$  mayores a otras técnicas, y por lo no es un método seguro de medida.

En este trabajo, sin embargo, se ha utilizado una sonda de oxígeno, la cual permite realizar la medida de la concentración de oxígeno disuelto en el medio con un tiempo de respuesta rápido, ya que de otra manera el método dinámico no daría resultados precisos.

El método dinámico clásico consta de dos etapas. La primera de ellas es la etapa de desorción, en la cual se hace pasar una corriente de nitrógeno por el medio para eliminar el oxígeno disuelto. Posteriormente, en la segunda etapa o etapa de absorción, se hace pasar una corriente de aire por el medio, midiéndose la variación de oxígeno con el tiempo.

Para realizar estas medidas, se han empleado distintas configuraciones de biorreactor y distintas condiciones de operación (caudal de aire y agitación) y medio BSM, en el cual se lleva a cabo el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.

El esquema de la aplicación del método dinámico basado en la desorción y absorción de oxígeno para medir el coeficiente de materia en ausencia de microorganismo, se muestra en la figura 3.6.

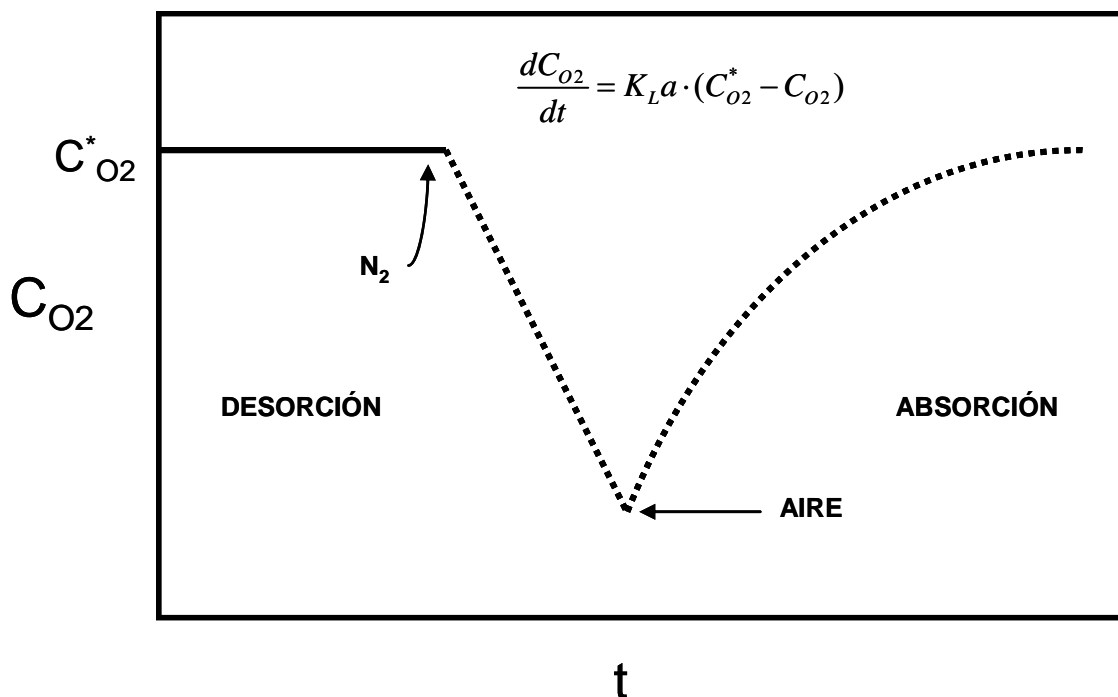


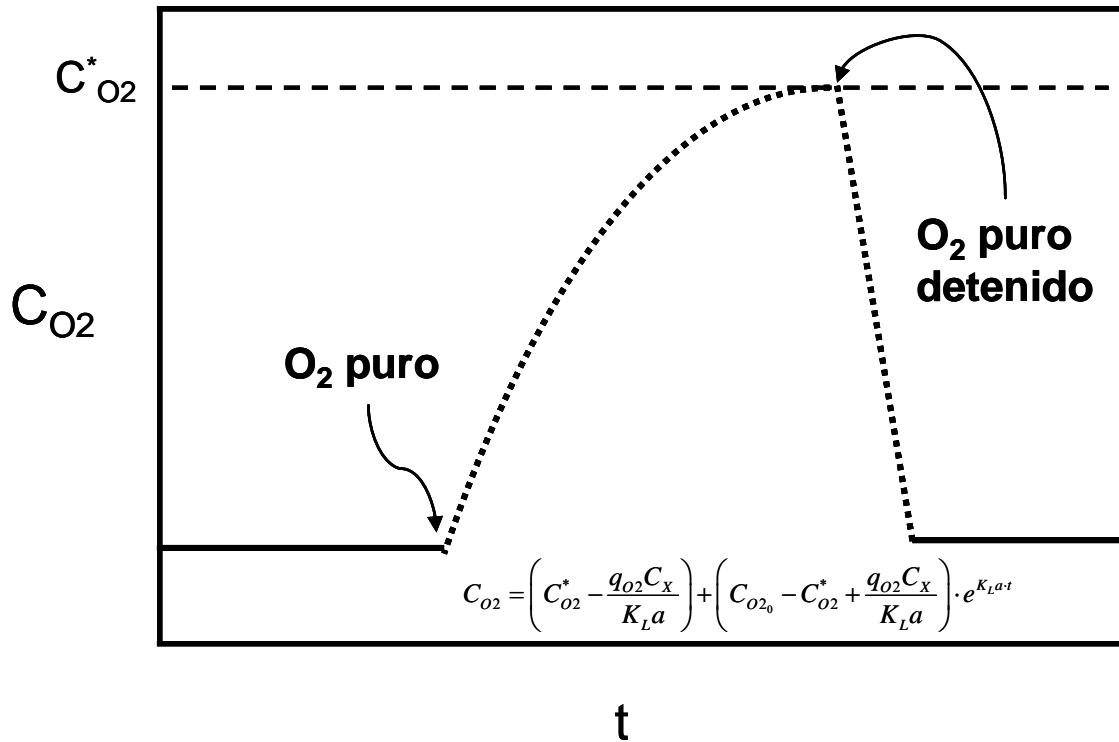
Figura 3.6. Esquema de la aplicación del método dinámico clásico basado en la desorción y absorción de oxígeno en ausencia de biocatalizador para medir el coeficiente de transferencia de materia ( $k_L a$ ).

#### **- Técnicas de medida de $K_L a$ en presencia de microorganismo**

El empleo de la técnica directa de  $k_L a$  se realiza en presencia de microorganismo, en condiciones reales. La variación de la concentración de oxígeno disuelto puede medirse tanto en condiciones estacionarias, los cuales requieren de equipos de elevado coste económico y por ello los menos utilizados, como en condiciones dinámicas, siendo los más utilizados por sencillez y exactitud (Dussap y col., 1985; Yang y col., 1988; Gao y Lee, 1992; Rane y Sims, 1994; Gómez y col., 1995; García-Ochoa y col., 2000; Gómez y col., 2006 y García-Ochoa y col., 2009), siendo esta la técnica empleada en este trabajo.

Como ya se ha comentado previamente, no ha sido posible utilizar el método dinámico clásico para medir el consumo y el transporte de oxígeno durante el crecimiento utilizando el medio BSM, debido a que el oxígeno disuelto es consumido

rápidamente en pocos minutos a pesar de suministrarse aire de forma continua. De modo que ha sido necesario utilizar el *método dinámico clásico modificado*, aplicando escalones de oxígeno puro (Fig. 3.7), para de este modo, incrementar la concentración de oxígeno en el medio en diferentes etapas del crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.



**Figura 3.7.** Esquema de la aplicación del método dinámico modificado para medir el coeficiente volumétrico de transferencia de materia ( $K_La$ ) con biotransformación, en el escalón de oxígeno puro- microorganismo.

Asumiendo que durante la realización de la medida,  $q_{O_2}$ ,  $C_X$ ,  $C^*$  y  $k_La$  se mantienen constantes, se pueden agrupar estas magnitudes en una nueva variable,  $A$ . En estas condiciones la ecuación 3.8 se puede escribir de la siguiente manera:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = A - K_La \cdot C_{O_2} \quad (3.18)$$

siendo A:

$$A = -K_L a \cdot C_{O_2}^* - q_{O_2} \cdot C_X \quad (3.19)$$

que integrando resulta:

$$\frac{A - K_L a \cdot C_{O_2}}{A - K_L a \cdot C_{O_2_0}} = e^{-K_L a \cdot t} \quad (3.20)$$

obteniéndose finalmente la siguiente ecuación para la etapa de absorción de oxígeno puro:

$$C_{O_2} = \left( C_{O_2}^* - \frac{q_{O_2} C_X}{K_L a} \right) + \left( C_{O_2_0} - C_{O_2}^* + \frac{q_{O_2} C_X}{K_L a} \right) \cdot e^{K_L a \cdot t} \quad (3.21)$$

En relación al efecto que produce la presencia de las células sobre el proceso físico de transporte de oxígeno, García-Ochoa y col., 2005, utilizando como biocatalizador la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279, recurrieron a la siguiente relación:

$$E = \frac{K_L a}{k_L a} \quad (3.22)$$

Donde E es factor de aumento, y el cual relaciona el coeficiente volumétrico de transferencia de materia en presencia y ausencia de microorganismo en el medio de cultivo. Dicho valor podría ser inferior, igual o superior a 1, indicando la existencia de diferencias entre ambos coeficientes, el cual estaría influido por la presencia de biotransformación y no sólo por la velocidad de agitación y el caudal de aireación.



### **3.4. RESULTADOS EXPERIMENTALES**

Existen pocos trabajos en literatura que aborden la desulfuración de DBT y sus derivados empleando como biocatalizador la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279. Los autores de la bacteria nativa (Gallardo y col., 1997; Galán y col., 2000a) utilizan la información correspondiente a los medios de cultivo y a las condiciones de operación, de los estudios realizados previamente con otros microorganismos, pertenecientes principalmente, a los géneros *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Gordona*.

Posteriormente, Martín y col., 2004, realizaron el estudio de la influencia de la composición del medio sobre el rendimiento de producción de biomasa y sobre la capacidad desulfurante de las células producidas, empleando como biocatalizador *Pseudomonas putida* CECT5279. Para ello, se modificó la concentración inicial de distintas fuentes de carbono y nitrógeno, observándose la variación de los rendimientos de producción de biomasa obtenidos a escala de agitador orbital. Las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, ácido glutámico y ácido cítrico, y como fuente de nitrógeno,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Asimismo, llevaron a cabo el correspondiente estudio cinético, el cual sigue el modelo logístico, obteniendo los parámetros que describen el crecimiento bacteriano, como son la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) y la concentración máxima alcanzada ( $C_X^{\text{max}}$ ).

Por otra parte, calcularon el rendimiento de biomasa obtenido con las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, evaluando su efecto sobre el crecimiento bacteriano. Además, calcularon la capacidad de desulfuración del microorganismo a distintas edades de crecimiento, proponiendo un modelo de la variación de la capacidad desulfurante a lo largo del crecimiento, a través del parámetro  $D_{\text{BDS}}$ . Este parámetro relaciona la concentración de biomasa obtenida a una edad de crecimiento determinada, con su capacidad desulfurante. También es el parámetro utilizado para definir la composición más óptima del medio, con el cual se consiguen las células con mayor capacidad desulfurante.

En un segundo estudio, y una vez definida la composición más adecuada para el crecimiento del microorganismo, Martín y col., 2005, llevaron a cabo el estudio de la

influencia de las condiciones de operación. En primer lugar, realizaron el estudio de la influencia de la temperatura durante el crecimiento, en un intervalo de trabajo comprendido entre 26 y 32°C. En dicho estudio pudieron observar como el crecimiento bacteriano era muy similar en todos los casos, excepto cuando la temperatura utilizada era de 32°C. Bajo estas condiciones la concentración máxima de biomasa obtenida era muy inferior que la obtenida con el resto de ensayos.

Posteriormente, realizaron el estudio del efecto del pH en el crecimiento sobre tres fuentes de carbono distintas (ácido glutámico, glucosa y citrato), los cuales se realizaron con y sin control de pH. Los mayores valores obtenidos tanto de biomasa, como de rendimiento de desulfuración, correspondieron al ensayo en el que utilizaron ácido glutámico como fuente de carbono sin control de pH durante el crecimiento.

Por último, se realizó un estudio de la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en el crecimiento del microorganismo. Se realizaron tres ensayos en bioreactor, en el cual modificaron el caudal de flujo de aire, entre 1 y 3 L/L·min, y utilizando el mismo caudal, realizaron ensayos con aire enriquecido al 75%, y en el cual determinaron que la mayor capacidad desulfurante se alcanzaba con un caudal de flujo de aire de 1L/L min.

Por otra parte, se han llevado a cabo estudios de biodesulfuración con *Pseudomonas putida* CECT5279 en condiciones de crecimiento. Caro y col., 2006 realizaron estudios de biodesulfuración utilizando DBT como única fuente de azufre en condiciones bifásicas, utilizando hexadecano como solvente orgánico en distintas proporciones, variando entre 0 y 50% v/v, utilizando el mismo caudal de aire y el mismo biorreactor.

En bibliografía, todos los trabajos encontrados para producir *P.putida* CECT5279 han utilizado agitador orbital o tanque agitado (Martin col., 2004 y 2005). En cambio, no se han encontrado trabajos en los que utilicen el biorreactor *air-lift* para el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas*, limitándose su uso para bacterias como *Escherichia Coli* (Guardia y col. 2000 y 2001), hongos (Fontana y col., 2009),

algas (Vilchez y col, 1995), células animales y vegetales (Fulzele y col., 1995) principalmente, debido su elevada sensibilidad frente al estrés hidrodinámico.

En este trabajo se pretende estudiar de forma conjunta el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 tanto en un biorreactor *air-lift* como en un biorreactor tipo tanque agitado, así como la relación con la capacidad desulfurante a distintas edades de crecimiento, para de ese modo determinar las mejores condiciones de producción del biocatalizador.

#### ***3.4.1. Estudio del crecimiento de Pseudomonas putida CECT5279 en biorreactor tipo air-lift***

El biorreactor más utilizado en la industria es el de tipo tanque agitado. Sin embargo, este presenta problemas relacionados con el proceso de agitación mecánica. Estos pueden provocar fuerzas de cizalla elevadas, de modo que no son adecuados para microorganismos con sensibilidad al estrés hidrodinámico.

Es necesario un aporte de energía para mover las palas agitadoras, de modo que mantengan la homogeneidad del medio y permitan la adecuada transferencia de oxígeno en el medio, favorecida por el efecto conjunto de la presencia de los agitadores y de los deflectores. En este tipo de sistemas es posible controlar la velocidad de agitación, permitiendo una mayor flexibilidad para tratar los cambios físicos del medio que influyen en la mezcla y al transporte de oxígeno a través del medio, provocado por una mayor demanda de oxígeno debida al aumento de la concentración de biomasa a lo largo del crecimiento.

En el biorreactor tipo *air-lift*, el suministro de oxígeno depende exclusivamente de la velocidad de aireación, la cual es la responsable de la homogeneidad del medio, siendo menos flexible que en el caso del biorreactor tipo tanque agitado. En cambio, presenta ventajas sobre dicho biorreactor, de modo que es muy adecuado para cultivos que presentan alta sensibilidad al estrés producido por las fuerzas de cizalla (Merchuk, 1990), debido a que el sistema de mezcla sólo por aireación es menos agresivo que el

caso de la agitación mecánica, ya que sólo se alcanzarían elevadas fuerzas de cizalla al utilizar flujos de aire muy elevados, lo que no es habitual. Por otro lado, el biorreactor posee una estructura más sencilla que el biorreactor tipo tanque agitado, de modo que su uso permite obtener un ahorro energético y económico, principalmente a escala industrial. Por tanto, este tipo de biorreactores limitan el estrés hidrodinámico a la vez que proporcionan una adecuada mezcla y transferencia de materia.

A pesar de que *Pseudomonas putida* CECT5279 es una bacteria muy demandante de oxígeno y que por lo tanto el tanque agitado podría ser el biorreactor más adecuado para su cultivo, sin embargo, estudios previos ya comentados han demostrado que el desarrollo de la capacidad desulfurante de las células se ve afectado por el transporte de oxígeno y no existe una relación directa entre un mayor aporte de oxígeno y una mayor capacidad desulfurante.

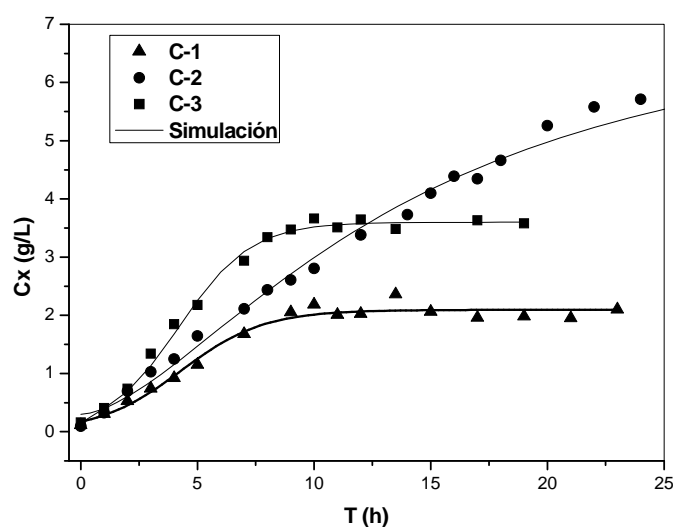
El estudio del oxígeno disuelto en el medio de crecimiento es clave para optimizar la producción del biocatalizador. Para conocer la influencia del oxígeno en el crecimiento y en la capacidad desulfurante de la bacteria se han llevado a cabo experimentos utilizando el biorreactor tipo airlift, con distintos caudales de aire: 2,4 y 8 L/min. Dichos experimentos se han descrito previamente en el apartado 2.5.3, y los cuales se han nombrado como C-1, C-2 y C-3 respectivamente. Estos representan los valores medios obtenidos de cada tanda de experimentos realizados por triplicado. Los parámetros estadísticos obtenidos tras el ajuste son la t de Student, F de Fischer y la suma de residuos (SRC) para un intervalo de confianza del 95%, los cuales proporcionan una idea de la bondad del ajuste realizado, así como de la fiabilidad de cada uno de los parámetros de la ecuación ajustada.

Para los experimentos C-1, C-2 y C-3, se ha aplicado el modelo de crecimiento correspondiente a la ecuación 3.6, tanto para los datos experimentales de concentración de biomasa y tiempo, como para el cálculo de los parámetros cinéticos  $\mu_{\max}$  y  $C_X^{\max}$ . Los valores de los parámetros del modelo cinético obtenidos al ajustar cada uno de los experimentos a la ecuación logística se muestran en la tabla 3.1, los cuales corresponden a los experimentos realizados a distinto caudal de aire respectivamente.

EXPERIMENTO		C-1	C-2	C-3
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Valor del parámetro	<b>0.17±0.10</b>	<b>0.24±0.11</b>	<b>0.65±0.10</b>
	t de student	8.60	4.41	5.65
$C_X^{\max}(\text{g/L})$	Valor del parámetro	<b>2.09±0.07</b>	<b>6.01±0.22</b>	<b>3.60±0.32</b>
	t de student	48	42.16	29.89
F de Fischer		551	1464	1645
SRC		0.0208	0.02879	0.0187
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	1.77	1.81	1.79
	F de Fischer	2.67	1.97	2.85

**Tabla 3.1.** Parámetros del modelo cinético de crecimiento obtenido para los experimentos C-1, C-2 y C-3.

Los parámetros estadísticos t de Student y F de Fischer, para los experimentos C-1, C-2 y C-3 se muestran en la tabla 3.1. Los valores obtenidos del ajuste son mayores que los correspondientes tabulados para un nivel de confianza del 95%. De modo, que puede concluirse que el modelo cinético propuesto es válido para predecir los resultados obtenidos en los experimentos realizados. En la figura 3.8 se representan los datos experimentales de concentración de biomasa recogidos a lo largo de los distintos crecimientos y la predicción del modelo utilizado para cada uno, descrito en el apartado 3.1.



**Figura 3.8.** Evolución y simulación de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo de crecimiento para los ensayos C-1, C-2 y C-3.

Antes de realizar los experimentos con *Pseudomonas putida* CECT5279, ha sido necesario obtener el coeficiente de transferencia de oxígeno para cada uno de los casos, obteniéndose a partir de la ecuación 3.17, en ausencia de microorganismo, para definir las condiciones hidrodinámicas en cada una de las condiciones de trabajo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2, y como cabría esperar, al aumentar el caudal de aireación se produce un aumento del valor del coeficiente de transferencia de oxígeno.

Experimentos	Biorreactor	$k_La$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$Qa$ (L/min)	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$C_{\text{max}}$ (g/L)
C-1	2L	$0.504 \pm 0.010$	2	0.17	2.09
C-2	2L	$0.857 \pm 0.015$	4	0.24	6.01
C-3	2L	$1.388 \pm 0.046$	8	0.65	3.6

**Tabla 3.2.** Condiciones de operación utilizadas, valores obtenidos de  $K_La$  en ausencia de microorganismo y los valores de  $\mu_{\text{max}}$  y  $C_{\text{max}}$  para los experimentos C-1, C-2 y C-3.

En relación al valor de la velocidad específica máxima de crecimiento, puede apreciarse que los valores obtenidos aumentan conforme aumenta el suministro de aire en el crecimiento, siendo de 0.17, 0.24 y 0.65  $\text{h}^{-1}$  para los experimentos a los que se ha modificado el caudal de aire de 2, 4 y 8 L/min respectivamente. Como se refleja en la figura 3.5, la fase estacionaria de crecimiento se alcanza antes para el experimento C-3, el cual es el de mayor caudal de aire suministrado a lo largo del proceso de producción.

Por lo tanto, al modificar las condiciones de transporte de oxígeno en el biorreactor durante el crecimiento, se alcanzan valores máximos de  $\mu_{\text{max}}$  con el mayor caudal de aire suministrado, o lo que es lo mismo, disminuyendo de ese modo, las limitaciones de transferencia de oxígeno en el medio, favoreciendo así el crecimiento.

Sin embargo, un mayor aporte de aire a lo largo del crecimiento, no garantiza una mayor producción de biomasa al final del proceso (Martín y col. 2005). En cuanto

al parámetro  $C_x^{\max}$ , los valores obtenidos van a variar con el caudal de aire. Los resultados obtenidos para los experimentos C-1, C-2 y C-3, son de 2.09, 6.01 y 3.60 g/L respectivamente. Como puede observarse, si se utilizan bajos caudales de aire se obtienen menores cantidades de biomasa. Al aumentar el caudal de suministro de aire, se observa no sólo un aumento de la velocidad de crecimiento, sino también un aumento de la concentración final de biomasa obtenida. En cambio, este comportamiento se ve alterado al suministrar un elevado caudal de aire, provocando que se obtenga una elevada velocidad de crecimiento, pero una menor producción de biomasa.

Por otro lado, de forma simultánea, se ha realizado un estudio de la capacidad desulfurante para todos los experimentos a distintas edades de crecimiento. Para obtener el valor de  $X_{BDS}$  se ha realizado el test rutinario de desulfuración, descrito en el apartado 2.5.4. Además, se han obtenido los valores experimentales del parámetro  $D_{BDS}$ , descrito en el apartado 2.5.4, correspondiente para cada uno de los experimentos. Todos estos valores se recogen en la tabla 3.3.

Experimento	C-1		C-2		C-3	
T(h)	$X_{BDS}$ (%)	$D_{BDS}$ (%·g/h·L)	$X_{BDS}$ (%)	$D_{BDS}$ (%·g/h·L)	$X_{BDS}$ (%)	$D_{BDS}$ (%·g/h·L)
3	10.23	2.53	5.82	2.00	1.29	0.57
6	13.66	4.53	11.76	3.54	24.31	10.21
12	14.68	2.46	50.54	14.24	27.71	8.46
24	13.52	1.18	4.83	1.15	2.71	0.41

**Tabla 3.3. Evolución del parámetro  $X_{BDS}$  y  $D_{BDS}$  a lo largo del crecimiento para los ensayos C-1, C-2 y C-3.**

En cuanto a la evolución del valor de  $X_{BDS}$  puede observarse de forma general, como a edades tempranas de crecimiento se obtienen bajas capacidades de desulfuración en todos los experimentos realizados. Sin embargo, en los distintos casos

van a evolucionar de forma diferente. En el experimento C-1 puede observarse como la capacidad desulfurante no se modifica de forma importante a lo largo de todo el crecimiento, incluso a elevados tiempos de crecimiento. Por otro lado, en el experimento C-2, se observa un aumento de la capacidad desulfurante conforme aumenta la edad de crecimiento, la cual se hace máxima para las 12 horas, obteniéndose un valor de  $X_{BDS}$  de 50.54%, siendo el valor máximo alcanzado en todos los experimentos realizados. Posteriormente, a edades bacterianas más elevadas, se produce una disminución drástica de la capacidad de desulfuración, siendo de 4.83%.

En el caso del experimento C-3, a pesar de tener una capacidad de desulfuración muy baja a edades tempranas de crecimiento, siendo de 1.29%, posteriormente aumenta y se mantiene prácticamente constante desde las 6 hasta las 12 horas de crecimiento, obteniéndose valores de  $X_{BDS}$  de 24.31 y 27.71% respectivamente y disminuyendo de forma sustancial a elevados tiempos de crecimiento, obteniéndose un valor de 2.71%.

La evolución del parámetro  $D_{BDS}$  varía en cada uno de los experimentos. En los experimentos C-1 y C-3, poseen una evolución similar, de modo que inicialmente poseen un valor muy bajo a edades tempranas, el cual se hace máximo para las 6 horas de crecimiento, obteniéndose valores de 4.53 y 10.21 %·g/h·L respectivamente, disminuyendo de forma gradual a edades más elevadas. En cambio, en el experimento C-2 la evolución de  $D_{BDS}$  es diferente a los anteriores. En este caso, conforme aumenta la edad de crecimiento se produce un aumento paulatino de dicho parámetro, hasta hacerse máximo a las 12 horas de crecimiento, obteniéndose un valor de 14.24 %·g/h·L y el cual disminuye drásticamente a las 24 horas de crecimiento, disminuyendo a 1.15 %·g/h·L.

De forma general, puede deducirse que al aumentar el caudal de aireación a lo largo del crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 en un biorreactor tipo *air-lift*, se produce un aumento de la velocidad de crecimiento y de la cantidad producida de biomasa, pero que sin embargo se observó un efecto adverso sobre la capacidad desulfurante, afectando de forma negativa a la estabilidad de las enzimas de la ruta 4S. Este comportamiento es similar al obtenido por Martín y col., 2005 en tanque agitado para la misma cepa.



Por otro lado, la mayor capacidad desulfurante se obtiene para el microorganismo de 12 horas de crecimiento en todos los casos, donde las células van a poseer la máxima actividad enzimática. Estos resultados son similares a los obtenidos por Martín y col., 2004. En dicho trabajo observaron que la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279, crecida en tanque agitado, poseía la máxima actividad desulfurante al final de la fase exponencial, con un tiempo de crecimiento comprendido entre 9 y 15 horas.

De todos los experimentos realizados en este trabajo, se ha observado que el ensayo C-2 es el más idóneo para producir esta bacteria en estas condiciones y utilizando en biorreactor tipo *air-lift*. Para llegar a esta conclusión se han tenido en cuenta, no sólo la capacidad desulfurante y la cantidad de biomasa producida, con la cual se alcanzan los valores máximos comparados con todos los ensayos realizados, sino también el tiempo necesario para obtener la producción, que en este caso son adecuados.

A pesar de que en el ensayo C-3 se alcanzan velocidades de producción más elevadas y se reducen casi a la mitad los tiempos de producción pero supone una pérdida del 52% de la capacidad desulfurante comparada con el ensayo C-2. Por tanto, prevalece la capacidad desulfurante frente al tiempo de producción del microorganismo.

#### ***3.4.2. Comparación del proceso de producción de Pseudomonas putida CECT5279 en distintas configuraciones de biorreactor***

En este apartado se quiere comparar la producción realizada en bioreactor tipo *air-lift*, descrita en el apartado anterior, el proceso habitualmente empleado en tanque agitado de igual capacidad. Como se ha comentado anteriormente, de todos los crecimientos realizados en el biorreactor tipo *air-lift*, se ha seleccionado el experimento C-2, debido a que en él, se obtiene la mayor capacidad desulfurante y la mayor cantidad de biomasa en un tiempo de crecimiento aceptable.

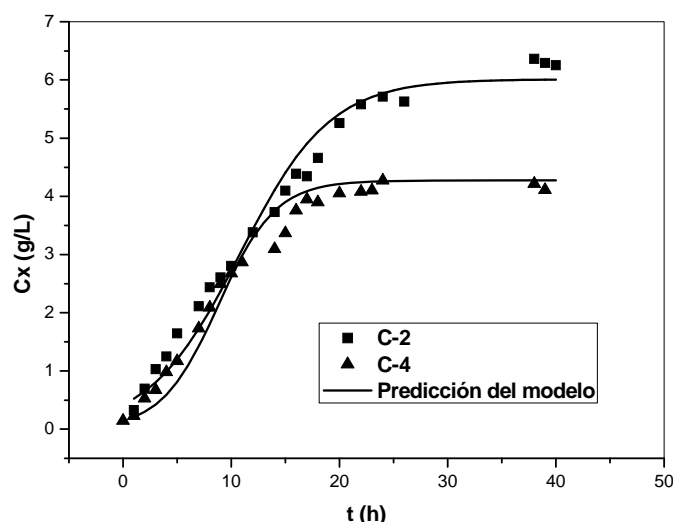
Por otro lado, la bacteria *Pseudomonas putida* CET5279 ha sido producida en biorreactor tipo tanque agitado siguiendo el procedimiento estándar propuesto por Martín y col., 2005, descrito en el apartado 2.5.3, y el cual se ha nombrado como C-4, siendo este nuestro ensayo de referencia.

En la tabla 3.4 se recogen los valores de los parámetros  $\mu_{\max}$  y  $C_X^{\max}$  obtenidos del ajuste de los valores experimentales aplicando el modelo logístico descrito en el apartado 3.2, y de los parámetros estadísticos, pertenecientes a los ensayos C-2 y C-4.

EXPERIMENTO		C-2	C-4
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Valor del parámetro	0.24±0.11	0.38±0.05
	t de student	4.41	5.28
$C_X^{\max}(\text{g/L})$	Valor del parámetro	6.01±0.22	4.27±0.15
	t de student	42.16	30.83
F de Fischer		1464	541
SRC		0.0287	0.4556
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	1.81	1.86
	F de Fischer	1.97	2.03

**Tabla 3.4. Parámetros del modelo cinético de crecimiento obtenido para los experimentos C-2 y C-4.**

En la figura 3.9 se muestra la evolución de los datos experimentales de la concentración de biomasa con el tiempo y los valores teóricos resultantes de la predicción del modelo utilizado. Por otro lado, los parámetros estadísticos (t de student y F de Fischer), para un nivel de confianza de 95%, son mayores que sus correspondientes tabulados, esto significa que el modelo cinético describe de forma satisfactoria los valores experimentales



**Figura 3.9.** Evolución y simulación de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo de crecimiento para los ensayos C-2 y C-4.

Si se comparan los valores obtenidos de la velocidad específica máxima para los experimentos C-2 y C-4, siendo de  $0.24$  y  $0.38 \text{ h}^{-1}$  respectivamente, puede observarse que la velocidad de producción es mayor para el tanque agitado, alcanzándose en menor tiempo la fase estacionaria.

Los valores obtenidos para el biorreactor tipo tanque agitado, correspondiente al ensayo C-4, están en concordancia con los valores determinados por Martín y col., 2004, utilizando el mismo protocolo experimental, los cuales obtuvieron valores de  $0.34 \text{ h}^{-1}$  y  $4.7 \text{ g/L}$  de velocidad máxima de crecimiento y concentración de biomasa máxima respectivamente.

En cambio, la concentración máxima producida en el crecimiento en tanque agitado es inferior, siendo de  $4.27 \text{ g/L}$  frente a los  $6.01 \text{ g/L}$  obtenidos para el crecimiento en biorreactor tipo *air-lift*.

Otro aspecto que se ha estudiado, es la influencia del crecimiento sobre la capacidad de desulfuración, la cual, no sólo va a estar afectada por el tipo de biorreactor utilizado, ya que como se ha comentado anteriormente existe una diferencia notable en el modo de suministrar aire a lo largo del crecimiento. Por otro lado, la

edad bacteriana va a influir sobre la actividad enzimática y por tanto en la capacidad desulfurante del microorganismo.

Experimento	C-2		C-4	
T(h)	X <sub>BDS</sub> (%)	D <sub>BDS</sub> (%·g/h·L)	X <sub>BDS</sub> (%)	D <sub>BDS</sub> (%·g/h·L)
6	11.76	3.54	12.36	3.06
12	50.54	14.24	26.46	6.32
24	4.29	1.15	23.33	4.15
40	0	0	5.25	1.24

**Tabla 3.5. Evolución del parámetro X<sub>BDS</sub> y D<sub>BDS</sub> a lo largo del crecimiento para los ensayos C-2 y C-4.**

En la tabla 3.5 se muestran los valores de X<sub>BDS</sub> y D<sub>BDS</sub> obtenidos al realizar el test estándar de desulfuración, utilizando el microorganismo recogido a distintos tiempos de crecimiento para los ensayos C-2 y C-4. En ambos casos la tendencia es muy similar, obteniéndose valores de X<sub>BDS</sub> muy bajos a edades tempranas de crecimiento y alcanzando el valor máximo de desulfuración para las 12 horas, obteniendo valores de 50.54 y 26.46%, para los ensayos C-2 y C-4 respectivamente.

Sin embargo, para tiempos superiores de crecimiento, se produce un cambio de tendencia, en el cual en el experimento C-2 se produce una caída acusada de este valor, obteniéndose valores de cero para tiempos de crecimiento muy elevados. En el caso del ensayo C-4, se mantiene prácticamente igual desde las 12 hasta las 24 horas de crecimiento, obteniéndose valores de 26.46 y 23.33% respectivamente. En este punto, la fase de crecimiento corresponde al final de la fase exponencial y a comienzo de la fase estacionaria. Finalmente, y como en el caso del experimento C-4, se obtienen valores muy bajos para tiempos de crecimiento de 40 horas. La tendencia de los resultados de X<sub>BDS</sub> correspondientes al experimento C-4, están en concordancia con los obtenidos por Martín y col., 2004, en la mismas condiciones de operación y tipo de

biorreactor, mostrando una máxima capacidad de desulfuración entre las 9 y las 15 horas de crecimiento.

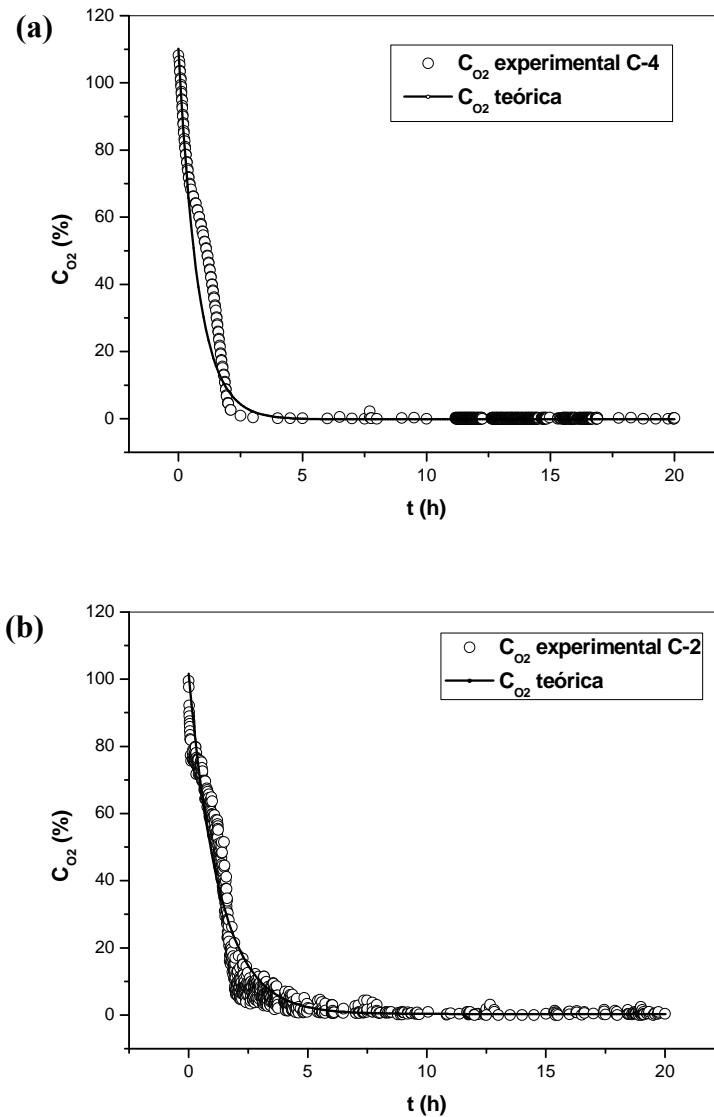
Otro parámetro utilizado para valorar la capacidad desulfurante es el valor de  $D_{BDS}$ . La tendencia para ambas configuraciones de reactor es prácticamente la misma, siendo muy bajo a tiempos cortos de crecimiento, y haciéndose máximo para las 12 horas de cultivo. Los valores obtenidos en esta fase de crecimiento son de 14.24 y 6.32 %·g/h·L para los ensayos C-2 y C-4 respectivamente. Para ambos casos, a tiempos elevados de crecimiento, se produce una caída de dicho valor, siendo más acusada en el experimento C-2, llegando a ser incluso de cero.

Por lo tanto, en el caso del biorreactor tipo *air-lift*, se va a obtener una mayor capacidad desulfurante en torno a la mitad de la fase exponencial, y se va a producir una mayor cantidad de microorganismo para el mismo tiempo de cultivo, respecto de los valores obtenidos para tanque agitado, a pesar de que la velocidad específica de crecimiento sea inferior.

Por otro lado, en la figura 3.11 se muestra la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo a lo largo del tiempo para los ensayos C-2 y C-4, así como la evolución teórica de los valores obtenidos utilizando la ecuación 3.12. En el caso del ensayo C-4, los valores de los parámetros necesarios para realizar la predicción según el modelo, ha sido tomadas del trabajo de Gómez y col., 2006.

Como puede observarse la figura 3.10, la caída de la concentración de oxígeno disuelto es muy similar en los dos tipos de biorreactores utilizados, disminuyendo rápidamente a valores cercanos a cero en las primeras horas de crecimiento, y manteniéndose en cero incluso cuando el microorganismo alcanza la fase estacionaria.

De forma independiente al biorreactor utilizado, se muestra que en ambos casos la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279 presenta una alta demanda de oxígeno durante el crecimiento, mostrando un comportamiento de consumo de oxígeno similar en ambos biorreactores en esas condiciones de operación.



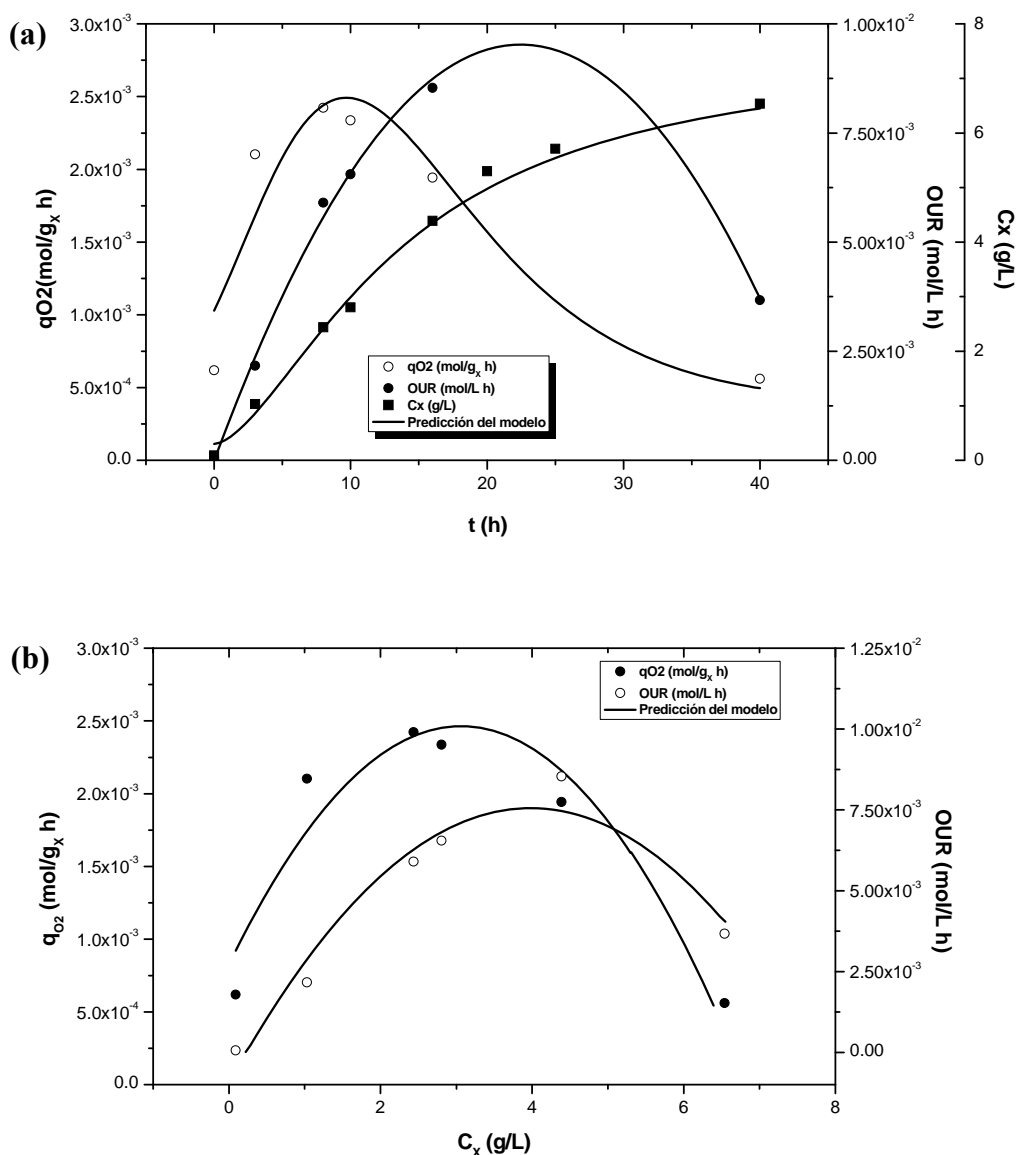
**Figura 3.10.** Evolución de la concentración de oxígeno disuelto experimental y teórica calculada integrando la ecuación 3.12 para los ensayos (a) C-2 y (b) C-4.

### ***3.4.3. Estudio del consumo y transporte de oxígeno en el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 en air-lift***

El estudio del consumo y transporte de oxígeno es fundamental en el caso de la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279, debido a que se trata de una bacteria aerobia estricta, la cual necesita oxígeno para crecer y mantenerse. En este apartado se ha abordado el estudio de los parámetros relacionados con el transporte de oxígeno en el medio de crecimiento (coeficiente de transferencia de materia,  $K_La$ ) y la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), en el biorreactor tipo *air-lift*, en las condiciones

establecidas para el ensayo C-2, aplicamos el método dinámico modificado descrito en el apartado 3.2.

La figura 3.11 muestra la tendencia de  $q_{O_2}$  y OUR con la concentración de biomasa y el tiempo de crecimiento para el ensayo C-2.



**Figura 3.11.** Evolución de los valores de  $q_{O_2}$  y OUR obtenidos teóricos y experimentales: (a) con el tiempo de crecimiento (b) con la biomasa, para el ensayo C-2.

Como puede observarse tanto  $q_{O_2}$  como OUR están influenciados por la edad de crecimiento del microorganismo. De modo que la velocidad específica de consumo comienza a aumentar de forma significativa en la fase latencia y en la primera parte de la parte de la fase exponencial, debido principalmente a un aumento notable de la producción de biomasa que lleva asociado un mayor consumo de oxígeno, alcanzándose los valores máximos en el intervalo de tiempo de las 8 y 12 horas de crecimiento, con un valor máximo de  $2.42 \cdot 10^{-3}$  mol/g<sub>x</sub>·h.

A partir de la segunda parte de la fase exponencial, se produce una disminución del consumo de oxígeno y la producción de biomasa se hace más lenta, de modo que se produce una disminución progresiva del valor de  $q_{O_2}$ .

Por otra parte, la variación de los valores de OUR sigue una tendencia muy parecida a los de  $q_{O_2}$ . De modo que a tiempos cortos de crecimiento aumenta de manera notable, coincidiendo con la fase latencia y el inicio del primer tramo de la fase exponencial. Posteriormente sigue aumentando hasta alcanzar el valor máximo alrededor de las 20 horas de crecimiento, coincidiendo con el final de la fase exponencial, y por tanto en el punto donde se va a dar una mayor demanda de oxígeno. A partir de la entrada en la fase estacionaria, se produce una disminución progresiva del valor de OUR hasta el final del crecimiento.

Para realizar la modelización del consumo de oxígeno, se han determinado los parámetros correspondientes al mantenimiento de la viabilidad celular, representado por el coeficiente de mantenimiento,  $m_{O_2}$ , y el relacionado con el crecimiento, representado por el rendimiento de consumo de oxígeno durante el crecimiento,  $Y_{O_X}$ .

Para su determinación se realizó una regresión no lineal utilizando la ecuación 3.14 a partir de los datos de OUR obtenidos experimentalmente. Los valores obtenidos de  $m_{O_2}$  y  $Y_{O_X}$  junto con los parámetros estadísticos resultantes para el ensayo C-2 se muestran en la tabla 3.5, siendo estos valores muy similares a los obtenidos por Gómez y col., 2006, en tanque agitado de 2L para el mismo biocatalizador, obteniendo valores de  $m_{O_2}$  y  $Y_{O_X}$  de  $5.16 \cdot 10^{-7}$  mol/g<sub>biomasa</sub>·s y  $5.26 \cdot 10^2$  mol O<sub>2</sub>/g<sub>biomasa</sub> respectivamente, siendo independientes del biorreactor utilizado.



		$m_{O_2}$ (mol O <sub>2</sub> /g <sub>biomasa</sub> · s) · 10 <sup>-7</sup>	$Y_{Ox}$ (mol O <sub>2</sub> /g <sub>biomasa</sub> ) · 10 <sup>-2</sup>
Valor del parámetro		7.55±0.24	3.61±0.21
t de Student		13.39	24.82
F de Fischer		994	
SRC		3.356 · 10 <sup>-8</sup>	
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	1.78	
	F de Fischer	1.69	

Tabla 3.6. Valores de los parámetros  $m_{O_2}$  y  $Y_{Ox}$  obtenidos a partir de la ecuación 3.10 correspondientes al experimento C-2.

A partir de los valores de  $m_{O_2}$  y  $Y_{Ox}$  obtenidos en la tabla 3.6, se han conseguido simular satisfactoriamente la evolución del oxígeno en los ensayos C-1, C-2 y C-3, utilizando la ecuación 3.14. La evolución y simulación de oxígeno para el ensayo C-2, se muestra en la figura 3.12.

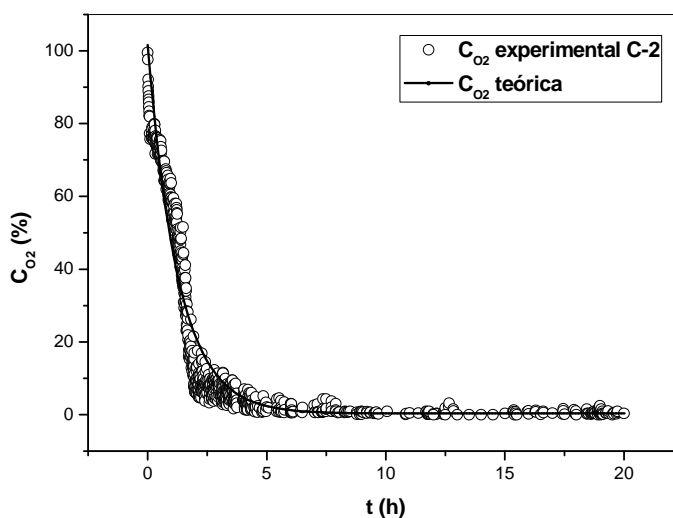


Figura 3.12. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto experimental y teórica calculada integrando la ecuación 3.14 para el ensayo C-2.

Previamente, Gómez y col., 2006, realizaron el estudio del consumo de oxígeno de la bacteria *Pseudomonas putida* CECT279 en tanque agitado de 2L de capacidad en las mismas condiciones de operación. Estos autores observaron como los valores de

OUR y  $q_{O_2}$  estaban influenciados por la fase de crecimiento del microorganismo. De modo, que en la fase inicial, con una baja concentración de microorganismo, el valor de  $q_{O_2}$  aumentaba de forma brusca en la fase latencia y en la primera etapa de la fase exponencial, alcanzando un valor máximo en esta fase de  $1.80 \cdot 10^{-2} \text{ mol/ g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$ . Este efecto se debía principalmente a un aumento en la producción de biomasa y a un elevado consumo de oxígeno en esta etapa. Posteriormente, a tiempos elevados de fermentación se producía una disminución gradual del valor de  $q_{O_2}$  y OUR, debido a que el rendimiento de producción de biomasa disminuía, así como el consumo de oxígeno de las poblaciones microbianas.

Comparando los resultados obtenidos en ambos tipos de biorreactores, puede concluirse que a pesar de tener una evolución de  $q_{O_2}$  muy similar a lo largo del crecimiento en ambos biorreactores, el consumo de oxígeno es muy superior en todas las fases cuando el proceso se lleva a cabo en tanque agitado frente a lo que ocurre en el biorreactor tipo *air-lift*. Este comportamiento está relacionado con la forma en la que se suministra el oxígeno en cada caso. Como se ha visto en el apartado anterior, el aporte de oxígeno durante la fermentación afecta de forma muy importante al crecimiento de la bacteria y por tanto a todo su mecanismo enzimático.

De forma simultánea al estudio del consumo de oxígeno a lo largo del crecimiento en el ensayo C-2, se ha realizado un estudio del transporte de oxígeno, de forma que se ha medido experimentalmente el valor del coeficiente de transferencia de oxígeno a distintas edades de crecimiento, aplicando el método dinámico modificado descrito en el apartado 3.2.

En la tabla 3.7 se muestran los valores de  $K_{La}$  obtenidos para distintas concentraciones de biocatalizador.

t(h)	$K_L a$ (min <sup>-1</sup> )	C <sub>x</sub> (g/L)
3	0.762	1.03
5	0.702	1.84
8	0.908	2.44
16	0.611	4.39
20	0.738	5.24
24	0.475	5.71

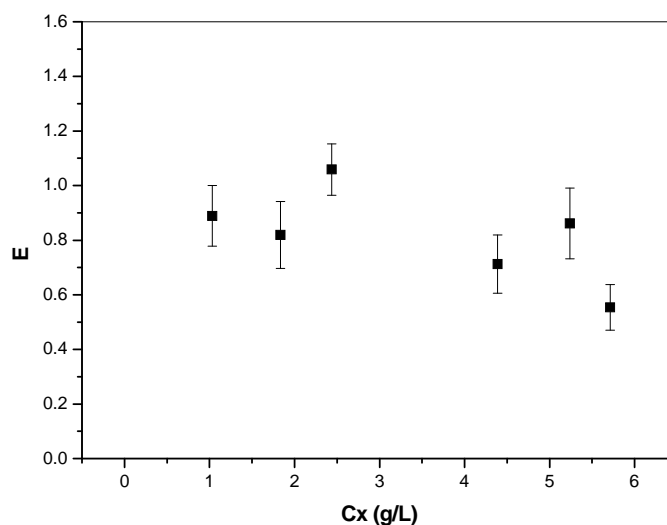
**Tabla 3.7. Valores de  $K_L a$  obtenidos a lo largo del crecimiento para el ensayo C-2.**

Inicialmente se puede apreciar un valor de  $K_L a$  cercano al obtenido en condiciones inertes, el cual posee un valor de  $0.857 \text{ h}^{-1}$ , debido a la baja concentración de bacteria producida. En el intervalo de concentraciones entre 1.8 y 5.2 g/L, el valor de  $K_L a$  inicialmente aumenta y posteriormente se mantiene constante, para finalmente disminuir de forma significativa a elevadas concentraciones. En este intervalo de concentraciones puede observarse una dispersión de resultados de  $K_L a$ , el cual puede estar causado por la influencia de las propiedades físico-químicas del medio (las cuales se ven modificadas con la producción de biomasa durante el crecimiento), configuración del biorreactor, o al método utilizado para la determinación del valor de  $K_L a$  (García-Ochoa y Gómez. 1998; Gogate y col., 2000 y Klein y col., 2002).

En la figura 3.13 se muestran los valores experimentales de  $E$  obtenidos para el ensayo C-2, utilizando la ecuación 3.22. Como puede observarse, los valores de  $E$ , prácticamente no presentan dispersión, lo cual hace que dicho valor permanezca constante e independiente de la concentración de biomasa. Para darle validez a estos resultados se ha tenido en cuenta que la desviación estándar es del 15%, debido a la dificultad de la medida del valor de  $K_L a$  anteriormente explicada.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Gómez y col., 2006 en tanque agitado, puede observarse una tendencia bien distinta. En este tipo de biorreactores se produce un aumento del valor de  $E$  a bajas concentraciones, alcanzando valores de 1, y aumentando con la concentración de biomasa, hasta

alcanzar un valor de 1.1, lo que significa que la transferencia de oxígeno se ve acompañada de un alto valor de OUR.



**Figura 3.13.** Valores del factor de aumento E experimentales correspondiente al experimento C-2.

#### ***3.4.4. ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOCATALIZADOR***

Para realizar los ensayos de biodesulfuración en condiciones de *resting-cell* en tanque agitado, descritos en el apartado 4.3, es necesario utilizar una gran cantidad de biomasa. La biomasa producida en los biorreactores de pequeño volumen (2L) era insuficiente, por lo que ha sido necesario realizar el escalado del proceso de crecimiento utilizando biorreactores de mayor volumen (15L), de forma que se obtenga una cantidad de biocatalizador suficiente para poder realizar los ensayos y que no altere la capacidad desulfurante del microorganismo.

La producción y desarrollo de procesos de bacterias y levaduras, se clasifican en tres tipos de escalas diferentes: laboratorio (o pre-planta piloto), donde se desarrollan los estudios elementales, planta piloto, en la cual se optimiza el bioproceso y la escala de producción, donde el bioproceso es llevado a escala industrial (Van Brunt y col., 1985). Posteriormente también se incluyó la escala de agitador orbital (Votruba y Sobotka, 1992) y micro escala, con el uso de biorreactores en miniatura (Micheletti y col., 2006).

La ratio habitual utilizado en el escalado de procesos biotecnológicos en la industria es de 1:10, aunque también es frecuente trabajar con una ratio 1:5, de ese modo se disminuye el riesgo de obtener resultados inesperados. El diseño de los procesos fermentativos a escala industrial se basa generalmente en el rendimiento obtenido de los prototipos a pequeña escala.

Algunos autores mantienen que el desarrollo del proceso de escalado ha de basarse en las variables físicas y químicas relacionadas con el medio de cultivo y el tipo de biorreactor (Young, 1979), y también en las variables biológicas (Jem, 1989 y Trilli, 1986).

Los factores biológicos se pueden ver modificados por el proceso de escalado, pudiendo afectar al número de generaciones producidas en las fases de crecimiento, así como la probabilidad de mutación o la vulnerabilidad por contaminación.

Por otro lado, los factores químicos incluyen los compuestos utilizados para el control de pH a lo largo del crecimiento, calidad y pureza del medio y del agua, así como la concentración en medio de las distintas fuentes de carbono, nitrógeno, y fosfato añadidas y la adición de agentes antiespumantes.

Los factores físicos van a incluir la agitación, aireación, presión hidrostática, esterilización del medio, control de temperatura y su transferencia en el interior del biorreactor, la mezcla y parámetros geométricos del biorreactor (tipo y tamaño de biorreactor, diseño y número de agitadores) (Votruba y col., 1979; Jem, 1989; Trilli, 1986; Junker, 2004 y García-Ochoa, 2009).

Existen cinco puntos a tener en cuenta a la hora de realizar el diseño de un proceso de escalado en biorreactores (Kawase y Moo-Young, 1990): estequiometría, termodinámica, cinética microbiana, fenómenos de transporte (de calor y materia) y económicos. De todos ellos, sólo los fenómenos de transporte y los económicos van a ser independientes de la naturaleza del microorganismo.

La determinación de las condiciones óptimas de operación a escala de producción industrial es un proceso costoso lo cual supone una gran inversión de tiempo y dinero, por lo que es necesario conocer previamente si un proceso funcionará correctamente a escala de laboratorio. Idealmente, un cambio de escala debería realizarse de forma que las condiciones utilizadas en los biorreactores de gran capacidad fueran lo más similares posibles a las que obtenían mejores resultados en los biorreactores de menor capacidad. El buen funcionamiento del proceso en el interior del biorreactor dependerá prioritariamente de la mezcla conseguida, por lo que sería adecuado mantener el tiempo de mezcla durante el cambio de escala. Sin embargo, en la práctica es complicado conseguirlo debido a la relación existente entre tiempo de mezcla y consumo de potencia.

Otro hecho importante, es el aumento de volumen del recipiente, el cual provoca un incremento del recorrido de la circulación del fluido en el interior del tanque, produciéndose una mezcla menos eficiente. Para mantener constante el tiempo de mezcla debería aumentarse la velocidad de agitación en el tanque en proporción directa a su tamaño.

De manera general, bajo condiciones turbulentas, la potencia por unidad de volumen es proporcional a la velocidad del fluido al cuadrado:

$$\frac{P}{V} \propto v^2 \quad (3.23)$$

donde P es la potencia suministrada, V es el volumen del líquido y v es la velocidad lineal del fluido.

De forma general, en el cambio de escala de biorreactores se produce una reducción de productividad y rendimiento como consecuencia de la menor eficacia de mezcla y de la alteración consiguiente del ambiente físico.

Para mejorar el procedimiento de diseño de un proceso de escalado, pueden utilizarse cuatro métodos ampliamente conocidos y habitualmente utilizados:

- *Métodos fundamentales*. Se basan en la aplicación de modelos matemáticos los cuales describen la influencia de las condiciones de operación, así como del diseño geométrico del biorreactor sobre el proceso de producción. Se hace por tanto imprescindible la resolución de los balances de transferencia de masa asociados a cada tipo de biorreactor. En los últimos años, se ha demostrado como la dinámica de fluidos computacional es una herramienta efectiva para estudiar las propiedades hidrodinámicas de los reactores, así como para el escalado de bioprocesos (Dhanasekharan y col., 2005). A pesar de ser métodos muy complicados, y de necesitar una gran cantidad de simplificaciones (Vasconcelos y col., 1998; Nedeltchev y col., 1999), es una de las herramientas más útiles para la determinación de las condiciones más apropiadas en el proceso de escalado.

- *Métodos semifundamentales*. Se basan en el uso de ecuaciones simplificadas con las cuales se va a obtener una aproximación práctica de las condiciones de operación. Los parámetros obtenidos dependerán del proceso de escalado, y de ese modo, la influencia de los parámetros puede reproducirse usando modelos de simulación matemáticos.

- *Análisis dimensional*. Es una herramienta conceptual, a través de la cual se pueden explicar fenómenos que implican la combinación de diferentes parámetros físicos. Se utiliza de forma habitual para la verificación de relaciones y cálculos, así como para construir hipótesis complejas, que posteriormente son verificadas experimentalmente. Este método está basado en el *requerimiento de consistencia dimensional*, en el cual los valores de los parámetros dimensionales, permanecen constantes a lo largo del proceso de escalado. Si todos los parámetros dimensionales permanecen constantes, la importancia relativa de los mecanismos o fenómenos implicados en el proceso no cambiará durante el proceso de escalado. Generalmente, es prácticamente imposible que todos estos parámetros permanezcan constantes a lo largo del proceso de escalado, por lo que se hace necesario determinar aquellos que son más importantes y basar el escalado solo en ellos.

- *Método de la regla general (the rule of thumb)*. Se trata del método más usado para el escalado de procesos a nivel industrial, y se basa en el uso de valores aproximados de los criterios utilizados en el proceso, siguiendo una tendencia lógica. Los criterios utilizados son los siguientes: potencia por unidad de volumen,  $P/V$ ; coeficiente

volumétrico de transferencia de masa,  $K_{La}$ ; velocidad de agitación; concentración de oxígeno disuelto en el medio,  $C_{O_2}$  (Margaritis y Zajic, 1978). Por tanto, no pueden mantenerse todos los parámetros de forma proporcional al pasar de una escala a otra, siendo necesario condiciones de operación diferentes para cada escala.

En el caso de un proceso de escalado realizado en dos tanques agitados, de similar configuración pero de distinta capacidad, 2 y 20L, con un factor de proporcionalidad de 1:10, se observa que las condiciones de operación necesarias para cada uno de ellos son distintas (Oldshue, 1966). Los resultados obtenidos mostraban como al mantener la relación P/V en ambos tanques, se producía un aumento de la velocidad de agitación en un 28%, y disminuyendo de forma significativa si se mantenía constante el número de Reynolds, obteniéndose una relación P/V inferior en el proceso de escalado, provocando una deficiente mezcla del medio.

El control de la velocidad de agitación tiene algunas ventajas, sobre todo en los bioprocesos con microorganismos sensibles al estrés hidrodinámico, pudiendo producirse un daño celular, el cual estará influenciado por el tamaño de las burbujas de gas formadas. Sin embargo, la reducción de la velocidad de agitación, provoca una reducción notable en la tasa de transporte de oxígeno.

Según los autores Figueiredo y Calderbank, 1979 y Shukla y col., 2001, parece que el mejor criterio para realizar el proceso de escalado es mantener la potencia por unidad de volumen o el coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

En la práctica, los cuatro métodos se utilizan de manera combinada, e incluso en muchas ocasiones se utiliza el método clásico prueba-error. Generalmente, es imposible realizar el escalado de un bioproceso manteniendo todas las condiciones de operación utilizadas a menor escala, por lo que es necesario considerar solo las más importantes.

En el caso de escalado de fermentaciones en los que se utilizan microorganismos aerobios, el factor más importante es el efecto del transporte de gas a



través del medio líquido. Por tanto, el escalado de fermentaciones aerobias esta habitualmente desarrollado en base al valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ( $k_La$ ) o en los casos en que la concentración de oxígeno en un momento dado, es despreciable frente a la concentración de saturación de oxígeno del medio de crecimiento, manteniendo la tasa de transferencia de oxígeno constante (Herbst y col., 1992; Garcia-Ochoa y col., 2000a; Shukla y col., 2001; Junker y col.2004, Bandaiphet y Prasertsan, 2006; Liu y col.,2006b y Garcia-Ochoa y col., 2009).

El éxito del proceso de escalado está habitualmente confirmado por los resultados experimentales, los cuales demuestran que no existe diferencia entre las distintas escalas de producción, siempre que se lleven a cabo bajo la misma tasa de transferencia de oxígeno.

Por otro lado, tanto los parámetros cinéticos de crecimiento, así como la cantidad de oxígeno consumido por el microorganismo deben de ser escalados de forma independiente al transporte de oxígeno en el medio, debido a que este va a depender exclusivamente de la configuración y tamaño del biorreactor.

Otro aspecto que complica aún más el proceso de escalado, es el efecto negativo de las condiciones de operación necesarias para obtener una adecuada transferencia de masa. El desarrollo local de las células en biorreactores de gran volumen varía en un amplio rango comparado con los biorreactores utilizados a escala de laboratorio. Esto es debido a la elevada heterogeneidad del medio de cultivo, necesitándose un mayor tiempo de mezcla, y por la producción de un mayor número de turbulencias generadas, así como de fuerzas locales de cizalla, las cuales se ven incrementadas al aumentar la escala del biorreactor. Bajo estas condiciones se produce una situación de estrés celular que puede afectar al crecimiento (Kieran y col., 2000).

La tasa de transferencia de oxígeno en las fermentaciones aerobias influye de forma determinante sobre el crecimiento microbiano y sobre los productos formados en su ruta metabólica a lo largo de la fermentación (Calik y col., 2004; Martín y col., 2006; Gómez y col., 2006). Por lo tanto, para mejorar el rendimiento de crecimiento

del microorganismo en el biorreactor, es necesario determinar la relación óptima entre las condiciones fisiológicas del microorganismo y las condiciones de operación utilizadas.

Cuando el coeficiente volumétrico de transferencia de masa,  $k_La$ , es relativamente alto, este no va a influir sobre el consumo de oxígeno del microorganismo. Sin embargo, esta situación puede cambiar en el caso de cultivos que posean un consumo elevado de oxígeno o en caldos muy viscosos, donde la disminución de  $k_L$  junto a la elevada actividad del microorganismo, mejora la transferencia de oxígeno, y el valor de  $k_La$  observado aumenta significativamente comparado con la absorción física producida en condiciones inertes.

La tasa de transferencia de oxígeno es, por tanto, el parámetro más importante en el diseño y escalado de biorreactores. En todos los procesos aerobios el oxígeno participa en el transporte y en las reacciones bioquímicas asociadas al microorganismo. Un diseño adecuado del biorreactor es muy importante para proporcionar un sistema de control que permita que las concentraciones de oxígeno en el medio permanezcan homogéneas en todo momento, ya que esto permitirá obtener un crecimiento óptimo. La aireación y la agitación en el medio son las variables más importantes que necesitan ser controladas, de forma que produzcan una tasa de transferencia de oxígeno adecuada, acorde con la tasa de consumo de oxígeno del microorganismo y con la concentración de oxígeno disuelto en el medio.

No se han encontrado trabajos en la literatura donde se realicen el proceso de escalado para la producción de la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279. En cambio, para el género *Pseudomonas* sp., tan sólo se ha encontrado el trabajo de Reiling y col., 1986, donde utilizan la cepa *Pseudomonas aeruginosa* realizando el proceso de escalado utilizando biorreactores tipo tanque agitado de 5 y 50L, con el objetivo de optimizar la producción de biosurfactantes.

Por otra parte, la mayoría de trabajos encontrados en bibliografía, relacionados con procesos de escalado de microorganismos, se limita tan sólo a tres especies:

*Escherichia Coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia Pastoris* (Thiry y col., 2002), las cuales tienen un gran interés en la industria alimenticia y farmacéutica.

Para llevar a cabo el proceso de escalado de *P. putida* CET5279 se ha utilizado el *método de la regla general*, el cual se basa en el mantenimiento del valor del coeficiente de transferencia de oxígeno al realizar el cambio de escala, por lo que es necesario determinar previamente las condiciones de operación más adecuadas, las cuales se estudian en el siguiente apartado.

#### ***3.4.4.1. Estudio de $k_{La}$ en tanque agitado de 15L de capacidad***

Las variables que afectan al valor del coeficiente de transferencia de materia,  $k_{La}$ , en condiciones inertes, son la configuración del reactor y las condiciones de operación, así como la velocidad de agitación y el caudal de aire suministrado. Por tanto, antes de realizar un proceso de escalado para cualquier microorganismo, es necesario conocer las propiedades hidrodinámicas del biorreactor que se va a utilizar, ya que estas van a determinar el éxito del escalado. Como se ha comentado anteriormente, el valor del coeficiente de transferencia de materia, es el parámetro más importante al desarrollar un proceso de escalado, teniendo que ser similar en los biorreactores de distinta capacidad.

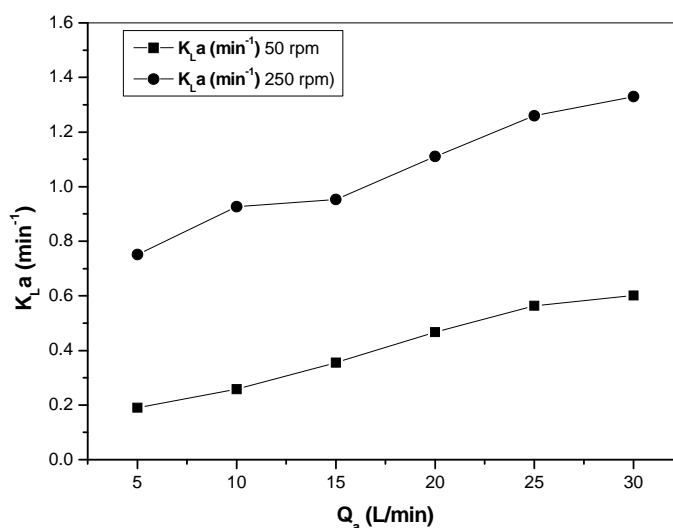
Para conocer las condiciones de operación más adecuadas para el proceso de escalado, ha sido necesario determinar la el efecto de la velocidad de agitación, así como del caudal de suministro de aire, sobre el valor de  $k_{La}$  para el biorreactor de 15L utilizado en este trabajo.

##### ***- Efecto del caudal de aire***

Los ensayos se realizaron empleando el mismo volumen y composición que el medio utilizado durante el crecimiento, descrito en el apartado 2.3.2. Se realizaron experimentos a distinta velocidad de agitación (50 y 250 rpm), a una temperatura de 30° C, y con un caudal de aire comprendido entre 5 y 30 L/min. Previamente a los

ensayos, se realizó el correspondiente calibrado del electrodo de oxígeno. La técnica empleada para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia ha sido descrita previamente en el apartado 3.2.2.

En la figura 3.14 se observan los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno obtenidos, observándose un aumento progresivo del valor de  $k_La$  al aumentar el caudal de aire al mantenerse la velocidad de agitación. En bibliografía se han encontrado estudios que confirman este aumento del valor de  $k_La$  con el aumento de la velocidad de aireación (Van't Riet, 1979; Vasconcelos y col., 2000; García-Ochoa y col., 2000 y 2001).

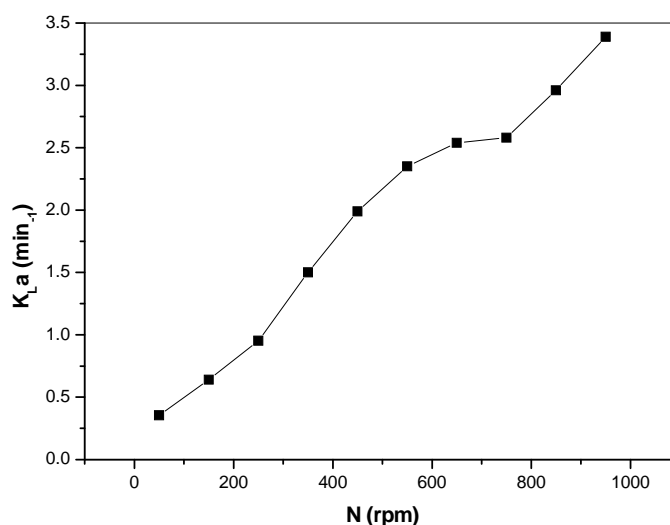


**Figura 3.14.** Influencia del caudal de aire sobre el  $k_La$  en tanque agitado de 15L de volumen.

#### ***- Efecto de la velocidad de agitación***

Los ensayos se realizaron utilizando el mismo volumen y composición de medio que el utilizado en los ensayos anteriores. Las condiciones de operación fueron de 30°C de temperatura, un caudal de aire de 15 L/min, y una velocidad de agitación comprendida entre 50 y 950 rpm.

En la figura 3.15 se observa como al aumentar la velocidad de agitación, el valor de  $k_La$  aumenta. A partir de estos resultados puede concluirse que la influencia de la velocidad de agitación sobre el valor del coeficiente de transferencia de oxígeno es mucho mayor comparado con la influencia del caudal de aireación. Por tanto, la agitación es el principal responsable de la dispersión del aire en el interior del biorreactor ya que va a ejercer un efecto pronunciado sobre la transferencia de masa (Van't Riet, 1979; Pedersen y col.1994, García-Ochoa y col., 2004, 2005 y 2009).



**Figura 3.15. Influencia de la velocidad de agitación sobre el  $K_La$  en tanque agitado de 15L de volumen.**

#### ***3.4.4.2. Proceso de escalado de *Pseudomonas putida* CECT5279***

A partir de los ensayos realizados en el apartado anterior, en el cual se estudiaba la influencia de la velocidad de agitación y el caudal de aire sobre el  $k_La$  en distintas condiciones en un tanque de 15L y en cual se seleccionaron aquellas que permitían mantener el valor de  $k_La$  constante respecto al obtenido en el tanque agitado de 2L.

La composición del medio, así como las condiciones de operación utilizadas han sido descritas en el apartado 2.5.3. Las condiciones finales de operación fueron de 30° C de temperatura, una velocidad de agitación de 50 rpm y un caudal de aire de

15L/min, sin control de pH. Posteriormente, se realizó otro ensayo en las mismas condiciones pero variando la agitación a 250 rpm, con el objetivo de observar la influencia de la agitación y del aumento del coeficiente de transferencia de oxígeno sobre el crecimiento bacteriano. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Los valores del coeficiente de materia en condiciones inertes, para los biorreactores de 2 y 15L de capacidad para las condiciones de crecimiento utilizadas, han sido calculados por el método descrito en el apartado 3.2.2. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.8.

Ensayo	Biorreactor	$k_{La}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	N (rpm)	Qa (L/min)
C-4	2L	$0.315 \pm 0.001$	250	2
C-5	15L	$0.355 \pm 0.007$	50	15
C-6	15L	$0.953 \pm 0.005$	250	15

**Tabla 3.8. Condiciones de operación utilizadas y valores obtenidos de  $k_{La}$  en ausencia de microorganismo, para los ensayos C-4, C-5 y C-6.**

Como puede comprobarse en la tabla 3.8, los valores de  $k_{La}$  en ausencia de microorganismo, para el ensayo C-4 y C-5 son muy similares, obteniéndose valores de  $0.315$  y  $0.355 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente. Por otra parte, el  $k_{La}$  obtenido para el ensayo C-6 en ausencia de microorganismo, es aproximadamente tres superior al obtenido en el ensayo C-5, observándose nuevamente, la gran influencia de la agitación sobre el  $k_{La}$ .

Una vez definida la transferencia de oxígeno en los dos tipos de biorreactores tipo tanque agitado, con distintas condiciones de operación de agitación y aireación, se llevó a cabo el estudio del escalado y de la influencia de la agitación sobre el crecimiento de *P. putida* CECT5279.

Para ello, se llevó a cabo el estudio cinético del crecimiento realizado para ensayos C-4, C-5 y C-6, desarrollados en tanques agitados de distinta capacidad y en distintas condiciones de operación. Durante el crecimiento se tomaron muestras de cultivo de forma periódica, para determinar la concentración de biomasa en cada momento, así como para el estudio de la capacidad de desulfuración de la bacteria en función de la edad de crecimiento.

Por otra parte, se han determinado los parámetros habituales de crecimiento para todos los ensayos: velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), y concentración máxima ( $C_x^{\max}$ ), los cuales se muestran en la tabla 3.9.

EXPERIMENTO		C-4	C-5	C-6
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Valor del parámetro	<b>0.38±0.05</b>	<b>0.58±0.03</b>	<b>0.19±0.03</b>
	t de student	5.28	4.62	3.05
$C_x^{\max}(\text{g/L})$	Valor del parámetro	<b>4.27±0.15</b>	<b>3.16±0.02</b>	<b>2.30±0.03</b>
	t de student	30.83	49.14	40.14
F de Fischer		541	1120	1710
SRC		0.4556	0.1310	0.8784
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	1.86	1.83	1.79
	F de Fischer	2.03	1.97	1.85

**Tabla 3.9.** Parámetros cinéticos obtenidos para los crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 realizados en biorreactores de 2 y 15 L de capacidad.

En todos los casos, los valores obtenidos de los parámetros estadísticos F de Fischer y t de Student, correspondientes a los ensayos C-4, C-5 y C-6 de los valores obtenidos del ajuste, son mayores que los correspondientes teóricos para un grado de confianza del 95%. Por tanto, puede concluirse que el modelo cinético es válido para predecir los valores experimentales obtenidos en los distintos biorreactores utilizados.

Como se ha comentado anteriormente, el factor más importante en el escalado de fermentaciones aerobias es el efecto del transporte de oxígeno a través del medio líquido, y ese ha sido el factor que se ha utilizado en este trabajo para realizar dicho proceso.

Al realizar el proceso de escalado manteniendo las condiciones de transporte de oxígeno a lo largo del crecimiento en ambas escalas de trabajo, se observan diferencias en los parámetros cinéticos calculados. En el ensayo C-5 se obtiene una mayor velocidad específica máxima de crecimiento, siendo de  $0.580 \text{ h}^{-1}$  frente a un valor de  $0.380 \text{ h}^{-1}$  correspondiente al experimento C-4. Sin embargo, es en el experimento C-4 en el cual se alcanza una mayor producción de biomasa en la fase estacionaria para el mismo tiempo de crecimiento, obteniéndose  $4.27 \text{ g/L}$  de biomasa, y un valor inferior para el experimento C-5 de  $3.16 \text{ g/L}$ .

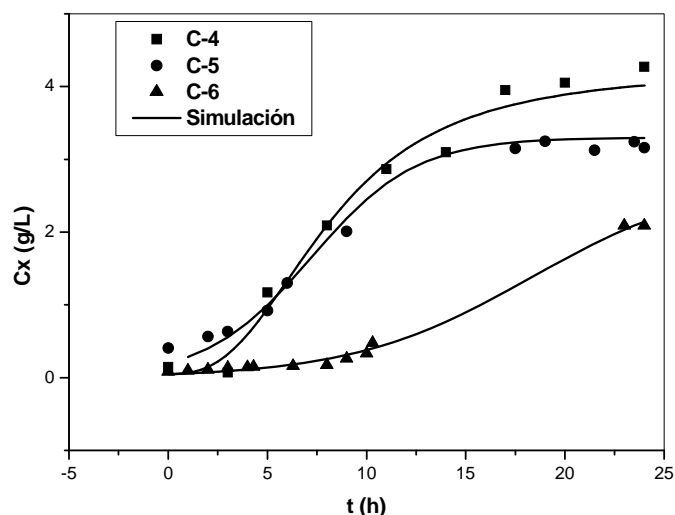
En el experimento C-6 se obtiene una menor velocidad específica máxima, respecto a los ensayos C-4 y C-5, siendo de  $0.221 \text{ h}^{-1}$ , y alcanzándose una concentración máxima de  $2.09 \text{ g/L}$ , muy inferior a las alcanzadas por los otros ensayos realizados. En este caso hay que tener en cuenta se han utilizado unas condiciones con un coeficiente de transferencia de oxígeno tres veces superior durante todo el crecimiento comparado con en el resto de experimentos.

Este comportamiento puede explicarse ya que una elevada agitación puede provocar efectos de cizalladura importantes, los cuales pueden dañar la integridad celular o ejercer algún cambio sobre su morfología y metabolismo (Merchuk, 1989 y 1990), por tanto, afectando al crecimiento bacteriano.

Por otra parte, la figura 3.16 muestra la evolución y simulación de la concentración de biomasa obtenida a lo largo del crecimiento en biorreactores de distinta capacidad, manteniendo la temperatura y la composición del medio. La producción de biomasa en las primeras horas de crecimiento para los experimentos C-4 y C-5, evolucionan de forma muy similar, pero comienzan a diferenciarse alrededor de la mitad de la fase exponencial. El experimento C-5 alcanza la fase estacionaria en un menor tiempo y se obtiene una menor concentración final de biomasa.

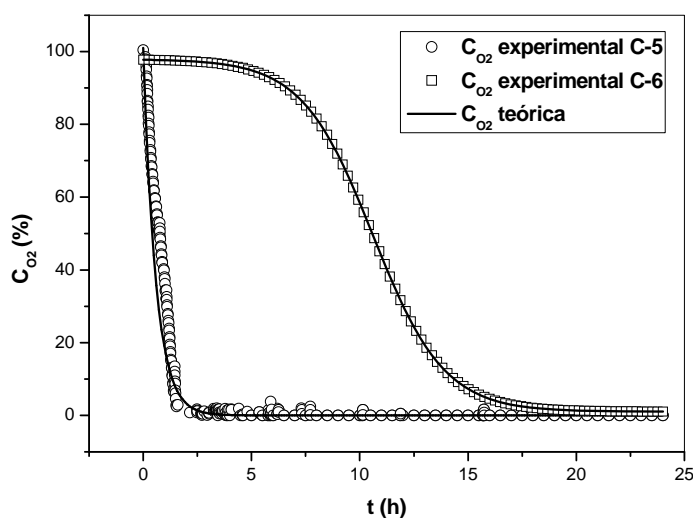


Como puede observarse en esta figura, el modelo cinético utilizado, reproduce adecuadamente la evolución de los datos experimentales, siendo por tanto capaz de describir la curva de crecimiento de la bacteria utilizada, en los distintos tamaños de biorreactores.



**Figura 3.16.** Evolución y simulación de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo de crecimiento para los ensayos C-4, C-5 y C-6.

En la figura 3.17 se recoge la evolución del consumo del oxígeno disuelto en el medio a lo largo del crecimiento en los ensayos C-5 y C-6.



**Figura 3.17.** Datos experimentales y teóricos de oxígeno disuelto para los ensayos C-5 y C-6 obtenidos al integrar la ecuación 3.8.

En el ensayo C-5 dicha evolución es muy similar al ensayo C-4, realizado en tanque agitado de 2L de capacidad, de forma que el microorganismo consume rápidamente el oxígeno disuelto en el medio de cultivo, cayendo rápidamente a cero en las primeras horas de crecimiento. La bacteria sigue el comportamiento habitual de consumo de oxígeno que lo caracteriza y posteriormente se mantiene en ese valor hasta prácticamente el final de la fermentación. En cambio, en el ensayo C-6, el consumo de oxígeno es mucho más lento, llegándose a consumir totalmente transcurridas 15 horas de crecimiento. En este ensayo, la velocidad de agitación y el  $k_L a$  son cinco y tres veces superiores respectivamente que en el caso del ensayo C-5, y aún así la bacteria tarda más tiempo en consumir el oxígeno suministrado.

Por otra parte se ha estudiado el desarrollo de la capacidad desulfurante, donde los valores de  $X_{BDS}$  y  $D_{BDS}$  a distintas edades de crecimiento correspondientes a los experimentos C-4, C-5 y C-6, se recogen en la tabla 3.10. En dichos experimentos, se tomaron muestras a distintos tiempos de crecimiento: 6, 12 y 24 horas. Posteriormente, se realizaron los correspondientes ensayos rutinarios de actividad para cada uno de ellos, descritos en el apartado 2.5.4.

ENSAYO	C-4		C-5		C-6	
T(h)	$X_{BDS}$ (%)	$D_{BDS}$ (%·g/h·L)	$X_{BDS}$ (%)	$D_{BDS}$ (%·g/h·L)	$X_{BDS}$ (%)	$D_{BDS}$ (%·g/h·L)
6	12.36	3.06	15.77	2.75	7.62	0.41
12	26.46	6.32	29.89	7.04	16.32	0.65
24	23.33	4.15	14.69	1.93	7.16	0.62

**Tabla 3.10.** Evolución del parámetro  $X_{BDS}$  y  $D_{BDS}$  a lo largo del crecimiento para los ensayos C-4, C-5 y C-6.

Como puede observarse, el valor máximo del parámetro  $X_{BDS}$  se obtiene al final de la fase exponencial para todos los experimentos, con un tiempo de crecimiento de 12 horas.

Los valores obtenidos para las distintas escalas de crecimiento correspondientes a los experimentos C-4 y C-5, son muy similares, siendo de 26.46 y 29.89% respectivamente. Por tanto, el proceso de escalado en esas condiciones de operación, en las cuales se mantiene el valor de  $K_{La}$ , no modifica ni la cantidad de microorganismo producido ni la capacidad desulfurante del mismo.

Por otro lado, en el experimento C-6 se obtienen valores de  $X_{BDS}$  inferiores a los anteriores en todas las edades de crecimiento, obteniéndose la máxima capacidad desulfurante para las 12 horas de crecimiento siendo de 16.32 %.

Otro aspecto a considerar es el tiempo que el microorganismo conserva la capacidad de desulfuración cercana al valor máximo. En el experimento C-4, la capacidad de desulfuración para un tiempo de crecimiento de 24 horas, mantiene un valor de  $X_{BDS}$  alto, siendo de 23.33%. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos por Gómez y col., 2006. En cambio, para el crecimiento realizado en tanque agitado de 15L en las mismas condiciones y para el mismo tiempo de crecimiento, el valor de  $X_{BDS}$  cae de forma significativa, alcanzándose un valor de 14.69%, por lo que se produce una pérdida de la capacidad desulfurante con la edad de crecimiento.

Esta misma tendencia ha sido también observada en el experimento C-6, donde la capacidad de desulfuración disminuye con el tiempo de crecimiento. Es importante resaltar que la capacidad de desulfuración es inferior en todas las edades de crecimiento, comparada con los dos crecimientos C-4 y C-5. Luego un exceso de aporte de aire a lo largo del crecimiento afecta de forma negativa a la capacidad de desulfurante.

Este mismo comportamiento fue observado por Gómez y col., 2006, en tanque agitado de 2L, los cuales variaron la velocidad de agitación entre 100 y 500 rpm para la misma cepa, obteniendo peores resultados de rendimiento de biomasa y de capacidad desulfurante para la mayor velocidad de agitación ensayada.

Este efecto puede estar debido a los efectos producidos por el aumento de agitación, ya que aumenta la concentración de oxígeno, y esta puede afectar a la estabilidad de las enzimas implicadas en el proceso de desulfuración (Gómez y col., 2006).

En cuanto a la evolución del valor de  $D_{BDS}$ , se observa como el valor máximo se alcanza para el microorganismo de 12 horas de edad de crecimiento en todo los casos, obteniéndose los mayores valores para los ensayos C-4 y C-5, siendo de 6.32 y 7.04 %·g/h· L respectivamente. También puede observarse como los valores son aproximados en ambos experimentos.

En el caso del experimento C-6, se observa que todos los valores de  $D_{BDS}$  para todas las edades de crecimiento son muy inferiores con respecto a los anteriores, por lo que se ratifica la influencia negativa del excesivo suministro de oxígeno sobre la capacidad desulfurante.

Resumiendo, el cambio de escala de tanque agitado de 2 a 15L requiere de las siguientes condiciones operativas: una agitación de 50 rpm, un caudal de aireación de 15L/min y una edad de crecimiento de 12 horas, para de ese modo obtener una cantidad de biomasa en un tiempo adecuado, y en la cual la capacidad desulfurante no se vea afectada.

## **CAPÍTULO 4. BIODESULFURACIÓN DE C<sub>x</sub>-DBT EN *RESTING-CELL***

<b>4.1. ESTUDIOS PREVIOS DE LA DESULFURACIÓN DE C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>143</b>
<b>4.2. ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN DE DBT Y C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>147</b>
4.2.1. Modelo cinético en medio acuoso.....	148
4.2.2. Modelo cinético en medio orgánico .....	153
<b>4.3. RESULTADOS DE LA CINÉTICA DE DBT Y C<sub>x</sub>-DBT .....</b>	<b>159</b>
4.3.1. Estudio cinético de la biodesulfuración de DBT .....	159
4.3.1.1. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase acuosa .....	159
4.3.1.2. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase orgánica .....	165
4.3.1.3. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase acuosa .....	168
4.3.1.4. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase orgánica .....	171
4.3.2. Estudio cinético de la biodesulfuración de C <sub>x</sub> -DBT .....	173
4.3.2.1. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase acuosa .....	173
Proceso de biodesulfuración de C <sub>x</sub> -DBT como único sustrato ...	173
Proceso de biodesulfuración de mezclas de C <sub>x</sub> -DBT .....	179
4.3.2.2. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase orgánica .....	183
Proceso de biodesulfuración de C <sub>x</sub> -DBT como único sustrato ...	183
Proceso de biodesulfuración de mezclas de C <sub>x</sub> -DBT .....	187
4.3.2.3. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase acuosa .....	192
Proceso de biodesulfuración de C <sub>x</sub> -DBT como único sustrato ...	192
Proceso de biodesulfuración de mezclas de C <sub>x</sub> -DBT .....	194
4.3.2.4. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase orgánica .....	197
Proceso de biodesulfuración de C <sub>x</sub> -DBT como único sustrato ...	197

Proceso de biodesulfuración de mezclas de Cx-DBT .....	199
<b>4.4. BIODESULFURACIÓN DE UNA MEZCLA HIDRODESULFURADA ..</b>	<b>203</b>

#### **4.1. ESTUDIOS PREVIOS DE LA DESULFURACIÓN DE DBT Y Cx-DBT**

Los compuestos heterocíclicos, como son DBT y sus derivados alquilados son los compuestos mayoritarios en las fracciones petrolíferas, los cuales presentan una alta resistencia a los procesos con los catalizadores químicos habituales, como es en el caso del proceso de hidrodesulfuración. Es conocido que algunas bacterias pertenecientes al género de *Rhodococcus*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus* pueden atacar al dibenzotiofeno produciendo 2-hidroxibifenilo a través de un proceso con ruptura de enlace C-S.

Sin embargo, pocas bacterias, como es el caso de *Arthrobacter* sp. ERCD-1 y *Rhodococcus erythropolis*, son capaces de atacar no solo al dibenzotiofeno (DBT) sino que incluso también a sus derivados alquilados (Cx-DBT), eliminando los átomos de azufre del mismo modo que en el caso anterior. De este modo se puede sugerir que el sistema enzimático utilizado para la degradación de DBT y sus derivados es el mismo para todos ellos (Kobayashi , 2000, Onaka y col., 2000, Osaka y col., 2001) apareciendo de ese modo, los correspondientes intermedios de los derivados alquilados para cada una de las etapas de la ruta 4S, obteniéndose como producto final libre de azufre el correspondiente compuesto alquilado monohidroxibifenilo.

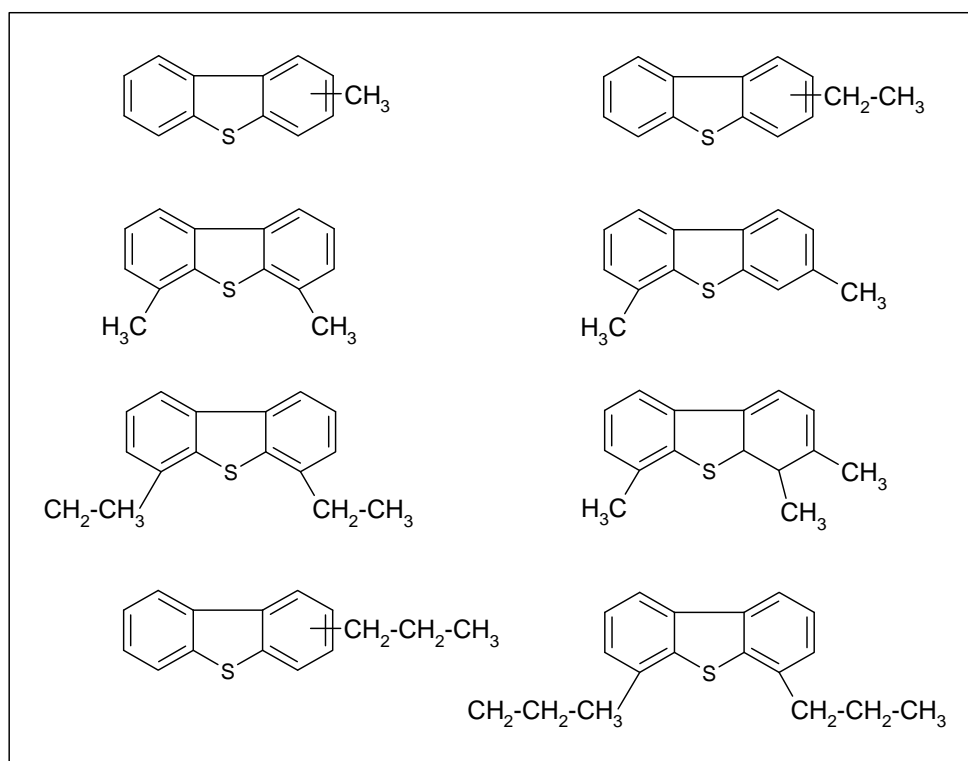
Existen diversos estudios realizados con células en crecimiento, en los cuales se emplea como única fuente de azufre DBT o el correspondiente derivado alquilado (Cx-DBT). En el caso de DBT, la bacteria más utilizada en estas condiciones es *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gallagher y col.; 1993, Wang y col., 1994 y 1996; Setti y col., 1995, 1996 y 1999; Honda y col., 1998; Matsui y col., 2000; Yan y col., 2000; Kishimoto y col., 2000; Grossman y col., 2001; Schilling y col., 2002; Watanabe y col., 2002; Konishi y col., 2005; Guchhait y col., 2005 A y B). Otra cepa utilizada en estas condiciones pero en menor medida ha sido *Pseudomonas* sp. (Setti y col., 1994 y 1997; Caro y col., 2008).

En el caso de los compuestos Cx-DBT, también se han realizado estudios con células en crecimiento, de modo que dichos derivados azufrados son añadidos como única fuente de azufre (Lu y col., 1999; Osaka y col., 2001; Noda y col., 2003; Gunam y

col., 2006). Por otro lado, también se han realizado trabajos con Cx-DBT en sistemas libres células (Nomua y col., 2005).

Sin embargo, el mayor número de trabajos encontrados en bibliografía corresponde a aquellos que utilizan *resting cell* como forma de operación. Dichos trabajos utilizan como biocatalizador distintas cepas como *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 (Kobayashi y col., 2000; Kobayashi y col., 2001; Onaka y col., 2000; Onaka y col., 2001; Noda y col., 2003), *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Kobayashi, 2000) *Paenibacillus* sp. A11-2 (Onaka y col., 2001), *Sphingomonas paucimobilis* sp. (Lu y col., 1999), RIPI-S81 (Rashidi y col., 2005) y *Pseudomonas delafieldii* R-8 (Luo y col., 2002).

Los Cx-DBT pueden clasificarse según su número de átomos de carbono, longitud y ramificación del sustituyente alquilado, así como su posición en el anillo aromático. En la figura 4.1 se muestran los compuestos Cx-DBT más utilizados por distintos autores con diferente grado de alquilación.



**Figura 4.1. Estructura química de los compuestos Cx-DBTs más representativos encontrados en bibliografía.**



La variedad de compuestos alquilados encontrados en bibliografía es muy extensa, encontrándose desde los más sencillos, como C<sub>1</sub>-DBT, con grupos metilo y etilo como sustituyentes, hasta los más complejos, con la presencia de varios sustituyentes en el anillo aromático.

Los compuestos C<sub>1</sub>-DBT representan a cuatro isómeros distintos con sustituyentes metilados o etilados en las posiciones 1, 2, 3 y 4 del anillo aromático. C<sub>2</sub>-DBT representa mayoritariamente isómeros con sustituyentes metilados o etilados, situados en dos posiciones pertenecientes a un mismo anillo aromático, o bien cada uno situados en una posición de cada anillo, siendo estos los compuestos derivados de DBT mayoritarios en la fracción obtenida tras el proceso de hidrodeshulfuración (Folsom y col., 1999). Los compuestos C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>-DBT, presentan generalmente sustituyentes metilados y etilados en las distintas posiciones de los anillos aromáticos, y aparecen generalmente en concentraciones muy bajas.

La estructura química de los sustituyentes de los compuestos Cx-DBT será determinante en su reactividad y no dependerá de forma prioritaria de la posición que ocupen en el anillo aromático. Sin embargo, según Osaka y col., 2001, aquellos compuestos que posean uno o dos sustituyentes en posiciones adyacentes al átomo de azufre, dificultarán la acción del biocatalizador, debido a la presencia de impedimentos estéricos. Sin embargo, el rendimiento de desulfuración de Cx-DBT se ve principalmente afectado por la estructura de los sustituyentes. Según algunos autores (Kobayashi y col., 2000), el rendimiento de biodesulfuración disminuye conforme aumenta el número de carbonos de los grupos alquilados. Este efecto puede explicarse ya que al aumentar el número de átomos de carbono del sustituyente alquilado, aumenta la hidrofobicidad del compuesto Cx-DBT, dificultando así su transferencia al interior celular, de naturaleza hidrofílica.

Los autores, Kobayashi y col., 2000, realizaron ensayos con la cepa *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 en condiciones de *resting cell*, para comprobar la reactividad del biocatalizador frente a distintos compuestos Cx-DBT, cuyos sustituyentes presentaban distinto grado de alquilación, comprendido entre C<sub>1</sub> y C<sub>6</sub>. Los rendimientos obtenidos para C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> eran ligeramente inferiores al DBT. Sin embargo, al aumentar el tamaño del sustituyente, se producía una notable disminución del rendimiento para los

compuestos C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>-DBT. En el caso de C<sub>6</sub>-DBT, las células fueron incapaces de atacarlo, cuyo efecto fue atribuido por los autores a la elevada hidrofobicidad de estos compuestos.

El objetivo de este trabajo es por tanto, el estudio cinético de la biodesulfuración de DBT y los compuestos Cx-DBT: 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT, de forma individual y en presencia de mezclas, utilizando como biocatalizador la bacteria *Pseudomonas putida* CECT5279. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones de *resting cell* en medio acuoso y bifásico, empleando como escalas de trabajo, agitador orbital y tanque agitado.

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de biodesulfuración está compuesto por dos etapas. La primera de ellas es la de producción o crecimiento del biocatalizador con capacidad desulfurante en las condiciones descritas en el apartado 2.5.

La segunda etapa es la de biodesulfuración, realizada por el microorganismo en condiciones de *resting cell*, el cual es introducido, bien en agitador orbital o en biorreactor tanque agitado, en función del tipo de experimento que se vaya a realizar, de forma que los compuestos azufrados se van a transformar en el correspondiente compuesto libre de azufre el cual se transfiere a la fase acuosa.

En la figura 4.2 se muestra el esquema de reacción de los Cx-DBT utilizados en este trabajo, y los compuestos finales libres de azufre que cabría esperar según el esquema de reacción similar a la ruta 4S.

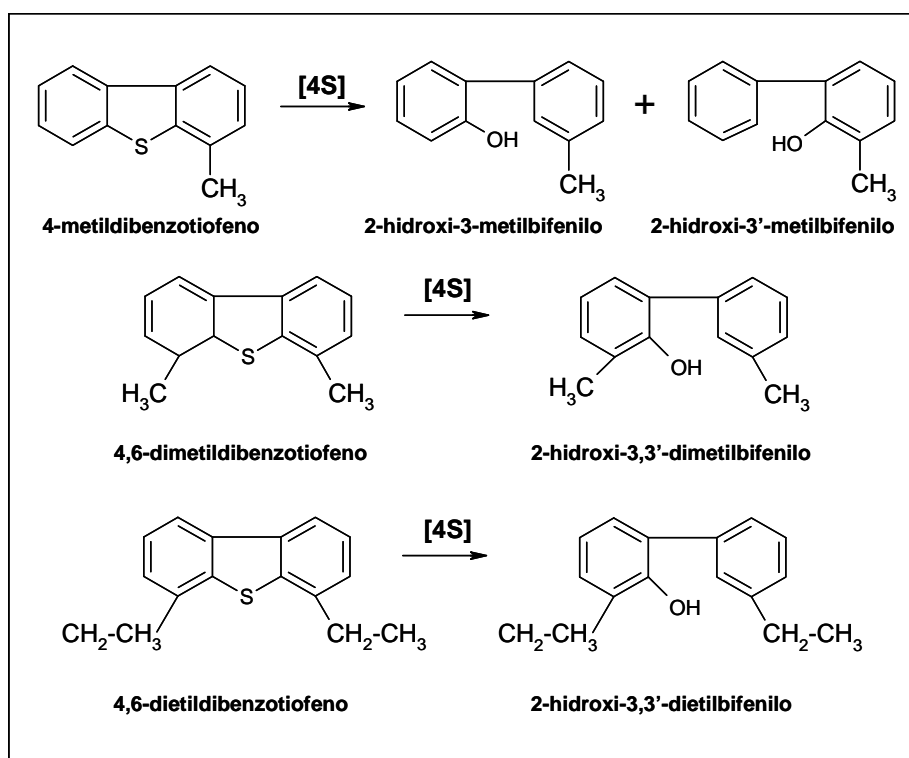


Figura 4.2. Esquema de reacción de los derivados alquilados de DBT utilizados en este trabajo metabolizados por la ruta 4S.

#### 4.2. ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BDS DE DBT Y Cx-DBT EN RESTING CELL

Para desarrollar el estudio cinético del proceso se ha trabajado en condiciones de *resting cell*, siendo esta la forma de operación más utilizada y estudiada en bibliografía para el estudio de la desulfuración de DBT, pero no así para sus derivados alquilados, de los cuales apenas existen estudios cinéticos en bibliografía..

A pesar de que no es habitual desarrollar un estudio cinético del proceso de desulfuración de DBT, así como la descripción de las reacciones en serie de la ruta 4S, existen excepciones. Folsom y col., 1999 y Kobayashi y col., 2001, trabajaron en condiciones bifásicas, utilizando como biocatalizador *Rhodococcus erythropolis* I-19, y una fracción hidrodesulfurada MD-1850 como fase orgánica, y *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 con diferentes compuestos Cx-DBT disueltos en tetradecano, ambos en tanque agitado de 2L.

Por otra parte, Luo y col.,2003, utilizaron *Pseudomonas delafieldii* R-8 para estudiar el proceso de desulfuración de DBT y 4,6DMDBT disueltos en dodecano, a escala de agitador orbital, en condiciones bifásicas.

Otros autores como Alcon y col.,2008, describen la cinética de biodesulfuración de DBT, así como de todos los intermedios de la ruta 4S, utilizando como biocatalizador *Pseudomonas putida* CECT5279, producido en tanque agitado, y en el cual los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de *resting cell* a escala de agitador orbital y en medio acuoso. Del mismo modo, Calzada y col., 2010, utilizando el mismo biocatalizador, realizaron el estudio del proceso de biodesulfuración de DBT en medio acuoso, añadiendo diferentes concentraciones y combinando distintas edades de biocatalizador.

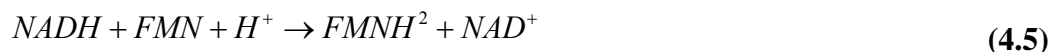
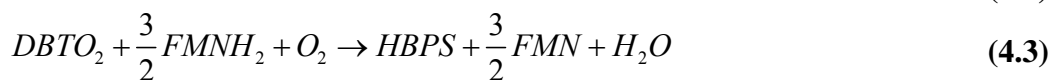
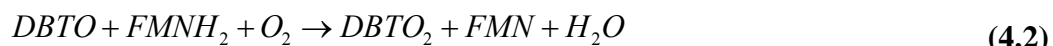
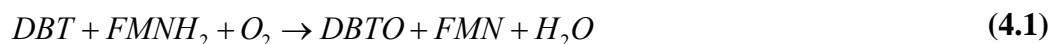
La mayoría de trabajos de biodesulfuración de Cx-DBT, encontrados en la literatura, no describen la cinética de desaparición en condiciones de *resting-cell*, sino que bien aportan únicamente los resultados como rendimientos de conversión, o bien se desarrollan en condiciones de crecimiento, utilizando los Cx-DBT como fuente de azufre.

El único estudio conocido en bibliografía que describa la cinética de desaparición de Cx-DBT, es el realizado por Kobayashi y col., 2001, anteriormente descrito. En dicho trabajo se obtuvieron las correspondientes velocidades específicas máximas de desaparición para cada uno de los compuestos alquilados, obteniendo los parámetros cinéticos por ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten en condiciones bifásicas.

A continuación se explican los modelos utilizados para describir la cinética de las reacciones realizadas en medio acuoso y bifásico.

#### ***4.2.1. Modelo cinético en medio acuoso***

Como ya se ha descrito anteriormente, *P. putida* CECT5279 lleva a cabo la desulfuración, a través de la ruta 4S, de DBT y Cx-DBT. De acuerdo al esquema de la ruta 4S (Fig. 1.10) se consideran las siguientes reacciones implicadas en dicha ruta (Alcon y col., 2008), según la estequiometría que a continuación se detalla:



Para realizar el estudio cinético se han empleado modelos cinéticos utilizados en bibliografía para simular la evolución de DBT en el proceso de biodesulfuración en sistemas con células en *resting cell* en medio acuoso. Para ello, varios autores proponen que la reacción de BDS se desarrolla siguiendo la cinética enzimática de Michaelis-Menten (Kobayashi y col, 2001; Luo y col., 2003; Jia y col., 2006; Rashtchi y col., 2006; Alcon y col., 2008). La ecuación de Michaelis- Menten se expresa a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{S} \frac{dS}{dt} = \nu = \nu_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad (4.6)$$

Donde  $\nu$  es la velocidad específica de consumo de sustrato de la reacción,  $S$  es la concentración de sustrato,  $\nu_{\max}$  es la velocidad específica máxima de consumo de sustrato y  $K_s$  es la constante de saturación del sustrato.

Por tanto, para describir la cinética de los ensayos de biodesulfuración con células en *resting cell* se ha utilizado la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación. 4.6), sin embargo, en los casos que exista inhibición por sustrato, por acumulación de HBP, la cinética se describe utilizando una modificación de la ecuación de Michaelis-Menten, que se muestra a continuación:

$$\frac{1}{S} \frac{dS}{dt} = \nu = \nu_{\max} \frac{S}{K_s + S \left( 1 + \frac{P}{K_I} \right)} \quad (4.7)$$

Donde  $P$  es la concentración de inhibidor, en este caso HBP, y  $K_I$  es la constante de inhibición.

Las ecuaciones cinéticas (4.1) a (4.3) para cada reacción se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten, y la ecuación (4.4) se ajusta a una reacción de inhibición por producto, las cuales quedarían descritas de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$v_1 = \frac{1}{S} \frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} S_{DBT}}{K_m + S_{DBT}} \quad (4.8)$$

$$v_2 = \frac{1}{S} \frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} S_{DBTO}}{K_m + S_{DBTO}} \quad (4.9)$$

$$v_3 = \frac{1}{S} \frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} S_{DBTO_2}}{K_m + S_{DBTO_2}} \quad (4.10)$$

$$v_4 = \frac{1}{S} \frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} S_{HBPS}}{K_m (1 + P_{HBP} / K_I) + S_{HBPS}} \quad (4.11)$$

El modelo cinético puede expresarse como una serie de reacciones en cadena representado por las correspondientes ecuaciones diferenciales para cada intermedio de la ruta 4S. Las correspondientes ecuaciones diferenciales se muestran a continuación:

$$v_{DBT} = v_1 = \frac{v_{\max 1} S_{DBT}}{K_{m1} + S_{DBT}} \quad (4.12)$$

$$v_{DBTO} = v_1 - v_2 = \frac{v_{\max 1} S_{DBT}}{K_{m1} + S_{DBT}} - \frac{v_{\max 2} S_{DBTO}}{K_{m2} + S_{DBTO}} \quad (4.13)$$

$$v_{DBTO_2} = v_2 - v_3 = \frac{v_{\max 2} S_{DBTO}}{K_{m2} + S_{DBTO}} - \frac{v_{\max 3} S_{DBTO_2}}{K_{m3} + S_{DBTO_2}} \quad (4.14)$$

$$v_{HBP} = v_4 = \frac{v_{\max 4} S_{HBPS}}{K_{m4} (1 + S_{HBP} / K_I) + S_{HBPS}} = \frac{v_{\max 4} S_{HBPS}}{K_{m4} + (K_{m4} / K_I) S_{HBP} + S_{HBPS}} \quad (4.15)$$

Debido a que no se han podido identificar los productos intermedios de la ruta 4S para los compuestos alquilados de DBT en fase acuosa y orgánica no se ha podido describir la cinética completa de dicha ruta.

Sin embargo, en fase acuosa se ha podido seguir la evolución de la concentración de los compuestos alquilados de partida a lo largo del tiempo, describiéndose su desaparición a través de la siguiente expresión:

$$v_{CxDBT} = \frac{1}{S_{CxDBT}} \frac{dS_{CxDBT}}{dt} = \frac{v_{max} S_{CxDBT}}{K_m + S_{CxDBT}} \quad (4.16)$$

Es necesario calcular dos constantes de velocidad máxima específica,  $v_{max}$  y constante de saturación,  $K_s$ . Para ello, existen varios métodos gráficos aunque desafortunadamente no se consiguen resultados precisos, de ahí que se hayan utilizado todos ellos para la obtención de los correspondientes valores de DBT y Cx-DBT en fase acuosa.

El primer paso en el análisis cinético de las reacciones biocatalíticas consiste en obtener datos de velocidad de reacción  $v$  en función de la concentración del sustrato  $s$ . Las velocidades de reacción pueden determinarse a partir de datos de concentración obtenidos en tanque agitado y agitador orbital a diferentes tiempos. Generalmente sólo se utilizan los datos de velocidades iniciales. Las velocidades iniciales y las correspondientes concentraciones iniciales se utilizan como parejas ( $v$ ,  $s$ ) que pueden representarse de diferentes maneras, para la determinación de  $v_{max}$  y  $K_m$ . Es preferible utilizar los datos de velocidad inicial para las reacciones biocatalíticas, como son la concentración de sustrato y de biocatalizador, ya que se conocen con mayor precisión al comienzo de la reacción.

Antes de realizar las distintas representaciones para obtener los valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  es necesario hacer el ajuste de los valores experimentales. Para ello, en primer lugar, todos los resultados experimentales se han ajustado a una función de tiempo conocida de tipo exponencial (ecuación 4.17), y posteriormente se ha hecho su correspondiente derivada numérica. La ecuación 4.6, muestra la función de tiempo utilizada para ajustar las concentraciones de cada uno de los compuestos, DBT y Cx-DBT, utilizados en este estudio:

$$C_{CxDBT} = Cx_0 + A \exp(-x/t) \quad (4.17)$$

Una vez ajustados los datos experimentales, se realizaron las derivadas numéricas correspondientes para cada compuesto, las cuales representan las velocidades de producción. Posteriormente, para obtener  $v_{max}$  y  $K_m$ , se han utilizado las siguientes modelos:

**Modelo de Lineweaver-Burk.**

Para esta representación es necesario utilizar un método de linealización con el fin de obtener una línea recta a partir de la cual pueda calcularse  $v_{max}$  y  $K_m$ . Invirtiendo la ecuación 4.6 se obtiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max} s} + \frac{1}{v_{max}} \quad (4.18)$$

Por lo que la representación de  $1/v$  frente a  $1/s$  daría una línea recta de pendiente  $K_m / v_{max}$  y ordenada en el origen  $1/v_{max}$ . Esta representación de los inversos de los valores de  $v$  y  $s$  se conoce como *representación Lineweaver-Burk*, y se encuentra frecuentemente en la bibliografía sobre reacciones biocatalíticas. Sin embargo el proceso de linealización utilizado en este método distorsiona el error experimental en  $v$ , por lo que estos errores se ven aumentados a concentraciones bajas de sustrato, por lo que puede producir resultados imprecisos.

**Modelo de Eadie-Hofstee**

De acuerdo con la ecuación 4.19, al representar  $v/s$  frente a  $v$  se obtiene una línea recta de pendiente  $-1/K_m$  y ordenada en el origen  $v_{max} / K_m$  que se denomina *representación de Eadie- Hofstee*. Al igual que con la representación de *Lineweaver-Burk*, la *linealización de Eadie- Hofstee* distorsiona los errores existentes en los datos originales por lo que este método presenta una precisión limitada.

$$\frac{v}{s} = \frac{v_{max}}{K_m} - \frac{v}{K_m} \quad (4.19)$$



### **Modelo de Langmuir**

La ecuación 4.20 reproduce la forma linealizada de la ecuación de Michaelis-Menten de acuerdo a la representación de Langmuir:

$$\frac{s}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} + \frac{s}{v_{\max}} \quad (4.20)$$

Por lo tanto la representación de Langmuir de  $s/v$  frente a  $s$  debería dar una línea de pendiente  $1/v_{\max}$  y ordenada en el origen de  $K_m/v_{\max}$ . La linealización de los datos para la representación de Langmuir minimiza la distorsión de los errores experimentales, por lo que es el ajuste más recomendado para obtener el valor de  $v_{\max}$  y  $K_m$ , y es el método de linealización que ha proporcionado las constantes cinéticas que mejor ajustan a los datos experimentales.

### **Modelo de Michaelis-Menten**

Este procedimiento consiste en representar directamente parejas de valores  $(v, s)$ . Los valores de  $v_{\max}$  y  $K_m$  pueden calcularse de manera aproximada, a partir de la siguiente representación:  $v_{\max}$  es la velocidad cuando  $s \rightarrow \infty$  y  $K_m$  es el valor de  $s$  cuando  $v = v_{\max} / 2$ . La precisión de este método es generalmente pobre debido a la dificultad de la extrapolación de  $v_{\max}$ .

Como se muestra posteriormente en el apartado 4.3.1.1, de los valores de  $v_{\max}$  y  $K_m$  obtenidos por todos los métodos, puede apreciarse como el método de Langmuir es el que mejor reproduce los valores experimentales, por lo que para DBT como para Cx-DBT, dichos valores son calculados de aplicando este método.

#### **4.2.2. Modelo cinético en medio bifásico**

Algunos autores describen las reacciones de biodesulfuración de DBT y Cx-DBT llevadas a cabo en sistemas bifásicos, como una cinética tipo Michaelis-Menten. Kobashayi y col., 2001 y Luo y col., 2003, realizaron estudios cinéticos de

biodesulfuración en condiciones bifásicas para distintos compuestos alquilados Cx-DBT, describiendo su conversión a través de una cinética tipo Michaelis-Menten, utilizando los biocatalizadores *Rhodococcus* RKA2-5-1 y *Pseudomonas delafieldii* R-8 respectivamente.

Caro y col., 2008, describieron la cinética de conversión de DBT en un sistema bifásico en condiciones de *resting cell*, a partir de constantes cinéticas aparentes, utilizando como biocatalizador *P. putida* CECT5279. Bajo estas condiciones, determinaron los coeficientes volumétricos de transferencia para DBT y 2HBP, teniendo en cuenta el modelo de la doble película y suponiendo que la concentración de estos compuestos en la fase acuosa era despreciable.

Del mismo modo, en este trabajo, en el cual se ha utilizado el mismo biocatalizador que en el trabajo de Caro y col., 2008, ha sido necesario determinar las constantes cinéticas ( $K_{Cx-DBT}$ ) de los derivados alquilados en las reacciones de biodesulfuración llevadas a cabo en sistemas bifásicos. Los problemas de difusión y de transporte de los productos desde la fase orgánica a la fase acuosa, así como el uso de surfactantes, han provocado que la cinética no se haya podido describir como una cinética Michaelis-Menten.

Por lo tanto, para realizar el estudio cinético de la reacción de biodesulfuración de Cx-DBT en medio bifásico, se han considerado sólo sus parámetros cinéticos aparentes, obteniéndose las constantes cinéticas correspondientes a cada compuesto. La relación entre velocidad de reacción y la concentración del producto se puede expresar de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$v_{\max} = -\frac{dC_{Cx-DBT}}{dt} = K_{Cx-DBT} \cdot C_{Cx-DBT} \quad (4.21)$$

Donde  $v_{CxDBT}$  es la velocidad volumétrica de la reacción y  $K_{Cx-DBT}$  es la constante cinética de los compuestos Cx-DBT.

Para determinar las constantes cinéticas de los compuestos Cx-DBT, se ha empleado el método integral. Los métodos integrales presentan ventajas frente a los

métodos diferenciales, ya que la precisión de los métodos numéricos de integración es mayor que la de los de derivación (García-Ochoa y col., 1989, 1990).

Para la obtención de los parámetros cinéticos aparentes de los compuestos Cx-DBT, se han tomado en primer lugar los datos experimentales en forma de pares de datos concentración- tiempo, y posteriormente se ha utilizado la ecuación 4.21 en su forma integrada, expresada por la ecuación 4.22, obteniéndose la constante cinética por ajuste lineal, siendo  $K_{Cx-DBT}$  la pendiente de dicho ajuste.

$$\ln\left(\frac{C_{CxDBT}}{C_{CxDBT_0}}\right) = -K_{Cx-DBT} \cdot t \quad (4.22)$$

#### **4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO CINÉTICO DE DBT Y Cx-DBT**

Los ensayos llevados a cabo en condiciones acuosas se resumen en la siguiente tabla:

<b>Experimento</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Cx (g/L)</b>	<b>ESCALA</b>	<b>TIPO</b>
<b>RAE-1.1</b>	DBT	0.7	E	A
<b>RAE-1.2</b>	4MDBT	0.7	E	A
<b>RAE-1.3</b>	4,6DMDBT	0.7	E	A
<b>RAE-1.4</b>	4,6DEDBT	0.7	E	A
<b>RAE-2.1</b>	DBT	1.4	E	A
<b>RAE-2.2</b>	4MDBT	1.4	E	A
<b>RAE-2.3</b>	4,6DMDBT	1.4	E	A
<b>RAE-2.4</b>	4,6DEDBT	1.4	E	A
<b>RAE-3.1</b>	DBT	2	E	A
<b>RAE-3.2</b>	4MDBT	2	E	A
<b>RAE-3.3</b>	4,6DMDBT	2	E	A
<b>RAE-3.4</b>	4,6DEDBT	2	E	A
<b>RAE-M</b>	DBT+4MDBT+4,6DMDBT+4,6DEDBT	4.2	E	A
<b>RBE-1</b>	DBT	10	E	B
<b>RBE-2</b>	4MDBT	10	E	B
<b>RBE-3</b>	4,6DMDBT	10	E	B
<b>RBE-4</b>	4,6DEDBT	10	E	B
<b>RBE-M-1</b>	DBT+4MDBT	10	E	B
<b>RBE-M-2</b>	DBT+4,6DMDBT	10	E	B
<b>RBE-M-3</b>	DBT+4MDBT+4,6DMDBT	10	E	B

**E:** Agitador orbital; **A:** Condiciones acuosas; **B:** Condiciones bifásicas;

**Tabla 4.1. Experimentos realizados para estudiar la cinética de biodesulfuración en condiciones de *resting cell* en fase acuosa y bifásica utilizando como sustratos DBT y Cx-DBT con y sin mezcla a escala de agitador orbital.**

Para todos los ensayos realizados en agitador orbital se utilizó un biocatalizador producido en un fermentador comercial tipo *air-lift* de 2L, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.3, con una edad celular de 12 horas.

Las reacciones llevados a cabo a escala de agitador orbital en condiciones acuosas se realizaron en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad, utilizando como fase acuosa Hepes a pH=8, y un volumen total de trabajo de 100 mL.

Los Erlenmeyers se agitaron a 250 rpm y a 30°C durante 3 horas, transcurridas las cuales se detuvo la reacción y se procedió al análisis de las muestras recogidas a

distintos tiempos. Se realizaron ensayos empleando distintas concentraciones de biocatalizador (0.7, 1.4 y 2 g<sub>biomasa</sub>/L), pero manteniendo la concentración inicial de cada compuesto objeto de estudio en 15 µM (DBT y Cx-DBT) de forma individual, realizándose cada uno de los ensayos por triplicado.

Del mismo modo, en las condiciones de trabajo anteriormente descritas, se realizó el estudio cinético de la mezcla formada por DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT con una concentración de 10 µM cada uno, y 4.2 g<sub>biomasa</sub>/L de biocatalizador.

En todos los ensayos realizados en medio acuoso, se ha mantenido la proporción concentración de compuesto azufrado y biomasa, en un intervalo entre 7-24 µmol/g<sub>biomasa</sub>.

Los ensayos llevados a cabo a escala de agitador orbital en medio bifásico, se realizaron en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad, utilizando como fase acuosa Hepes a pH=8, a los cuales se añadió 0.5% (v/v) de etanol y 1% (v/v) de Tween 85. La fase orgánica estaba formada por 108 µM de DBT y Cx-DBT, de forma individual, previamente disueltos en hexadecano, con un volumen total de trabajo de 100 mL y una relación de fases 1:1. En todos los ensayos se utilizaron 10 g<sub>biomasa</sub>/L de biocatalizador. Las condiciones de operación fueron 250 rpm, 30°C de temperatura y 5 horas de reacción.

En relación a los ensayos medio bifásico a escala de agitador orbital, se llevaron a cabo mezclas de DBT y de compuestos Cx-DBT de distinto grado de alquilación, con una concentración de 108 µM cada uno y previamente disueltos en hexadecano, manteniendo la relación entre las fases de 1:1. La fase acuosa estaba compuesta por 10 g<sub>biomasa</sub>/L de biocatalizador de 12 horas de crecimiento, procedente de un biorreactor *air-lift* y Hepes a pH=8, al que se añadieron 0.5% (v/v) de etanol y 1% (v/v) de Tween 85. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron las mismas que en los ensayos anteriores.

En estos ensayos en medio bifásico, se mantuvo la proporción entre la biomasa empleada y la concentración de compuesto azufrado en un intervalo similar al empleado en medio acuoso, variando en un intervalo de 7 y 31 µmol/g<sub>biomasa</sub>.

Una vez realizados los ensayos a escala de agitador orbital, se realizaron también a escala de tanque agitado, tanto en condiciones acuosas como bifásicas, utilizándose los mismos sustratos (DBT y los compuestos Cx-DBT anteriormente descritos). Para estos ensayos se utilizó un biocatalizador de 12 horas de crecimiento, producido en tanque agitado de 15L, en las condiciones descritas en el apartado 2.5.3.

Todos los ensayos realizados en tanque agitado de 2L quedan recogidos en la tabla 4.2.

Experimento	Compuesto	Cx (g/L)	Escala	TIPO
RAT-1	DBT	1	TA <sup>4</sup>	A <sup>2</sup>
RAT-2	4MDBT	1	TA	A
RAT-3	4,6DMDBT	1	TA	A
RAT-M-1	DBT+4MDBT	1	TA	A
RAT-M-2	DBT+4,6DMDBT	1	TA	A
RAT-M-3	DBT+4MDBT+4,6DMDBT	1	TA	A
RBT-1	DBT	15	TA	B <sup>3</sup>
RBT-2	4MDBT	15	TA	B
RBT-3	4,6DMDBT	15	TA	B
RBT-4	4,6DEDBT	15	TA	B
RBT-M-1	4MDBT+4,6DMDBT+4,6DEDBT	15	TA	B
RBT-M-2	DBT+4MDBT	15	TA	B

E: Agitador orbital; A: Condiciones acuosas; B: Condiciones bifásicas; TA: Tanque agitado 2L

**Tabla 4.2. Experimentos realizados para estudiar la cinética de biodesulfuración en condiciones de resting cell en fase acuosa y bifásica utilizando como sustratos DBT y Cx-DBT en tanque agitado de 2L.**

Las condiciones utilizadas para los ensayos acuosos en *resting cell* en tanque agitado fueron de 250 rpm de agitación, un caudal de aireación de 1L/L min, 30°C de temperatura y 5 horas de reacción. El medio de reacción estaba formada por Hepes a pH=8, 10  $\mu$ M de DBT y de cada Cx-DBT utilizado en los ensayos individuales y 1 g<sub>biomasa</sub>/L de biocatalizador, con un volumen total de trabajo de 500 mL.

En estos ensayos se tomaron muestras a lo largo de la reacción que fueron posteriormente analizadas por HPLC-DAD según se indica en el apartado 2.6.2.

En las mismas condiciones de trabajo se estudiaron las mezclas binarias formadas por 10  $\mu$ M de DBT y 10  $\mu$ M de Cx-DBT (4MDBT o 4,6DMDBT) y la mezcla ternaria formada por 10  $\mu$ M de DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT.

Por otro lado, se realizó el estudio cinético del proceso de biodesulfuración en condiciones bifásicas a escala de tanque agitado de 2L. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la conversión de DBT y Cx-DBT de manera individual, donde la fase orgánica estaba compuesta por de 271  $\mu\text{M}$  de cada uno de ellos, previamente disueltos en hexadecano, cuya proporción en el medio de reacción era del 50% (v/v). Posteriormente, se añadió 1% (v/v) de Tween 85 y 0.5% (v/v) de etanol. La fase acuosa utilizada estaba compuesta por Hepes a pH=8 y 15  $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{L}$  de biocatalizador. Las condiciones de operación fueron de 250 rpm, 30°C de temperatura, un caudal de aireación de 1L/L·min y 24 horas de reacción.

De igual forma, se llevaron a cabo ensayos utilizando mezclas de sustratos. En un primer ensayo se utilizó una mezcla de 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT, con una concentración de de 54  $\mu\text{M}$  de cada uno de ellos, utilizando las mismas condiciones de operación anteriormente descritas.

Por otro lado, se llevó cabo la desulfuración de otra mezcla formada por 271  $\mu\text{M}$  de DBT y de 4MDBT, la cual fue realizada en las mismas condiciones de operación anteriormente descritas.

#### ***4.3.1. Estudio cinético de la biodesulfuración de DBT***

##### ***4.3.1.1. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase acuosa para DBT***

Como se ha descrito anteriormente, la cinética de biodesulfuración de DBT y Cx-DBTs con células en *resting cell* en fase acuosa se va a describir utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 4.6). Por lo tanto es necesario obtener los valores de  $v_{\text{max}}$  y  $K_m$ , para las cuales se han utilizado los métodos descritos en el apartado 4.2.1.

Los valores de  $v_{\text{max}}$  y  $K_m$  correspondientes a DBT, en los ensayos acuosos a distinta concentración de biocatalizador, se muestran en la tabla 4.3.

	RAE-1.1			RAE-2.1			RAE-3.1		
	$v_{max}$	$K_m$	$R^2$	$v_{max}$	$K_m$	$R^2$	$v_{max}$	$K_m$	$R^2$
<b>L</b>	0.218	1.060	0.99	0.109	1.060	0.95	0.076	1.060	0.94
<b>L-B</b>	0.225	5.952	0.99	0.665	7.174	0.98	0.423	7.299	0.96
<b>E-H</b>	0.173	2.924	0.97	0.063	4.309	0.99	0.103	0.685	0.98
<b>M-M</b>	0.074	0.038	0.94	0.067	1.901	0.95	0.075	0.501	0.97

$v_{max}$  :  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min}$ ;  $K_m$ :  $\mu\text{M}$

**Tabla 4.3.** Velocidades específicas calculadas para DBT para los experimentos RAE-1.1, RAE-2.1 y RAE-3.1, utilizando las representaciones de Langmuir (L), Lineweaver-Burk (L-B), Eadie-Hofstee (E-H), y la representación de Michaelis-Menten (M-M).

Debido a la disparidad de valores obtenidos al aplicar los diferentes métodos, se comprobó que la linealización de los datos utilizando el modelo de Langmuir, minimizaba la distorsión de los errores. Por esta razón, en los estudios cinéticos correspondientes a los compuestos Cx-DBT en Erlenmeyer y tanque agitado en fase acuosa, se ha utilizado únicamente el modelo de Langmuir para la obtención de los correspondientes parámetros cinéticos,  $v_{max}$  y  $K_m$ .

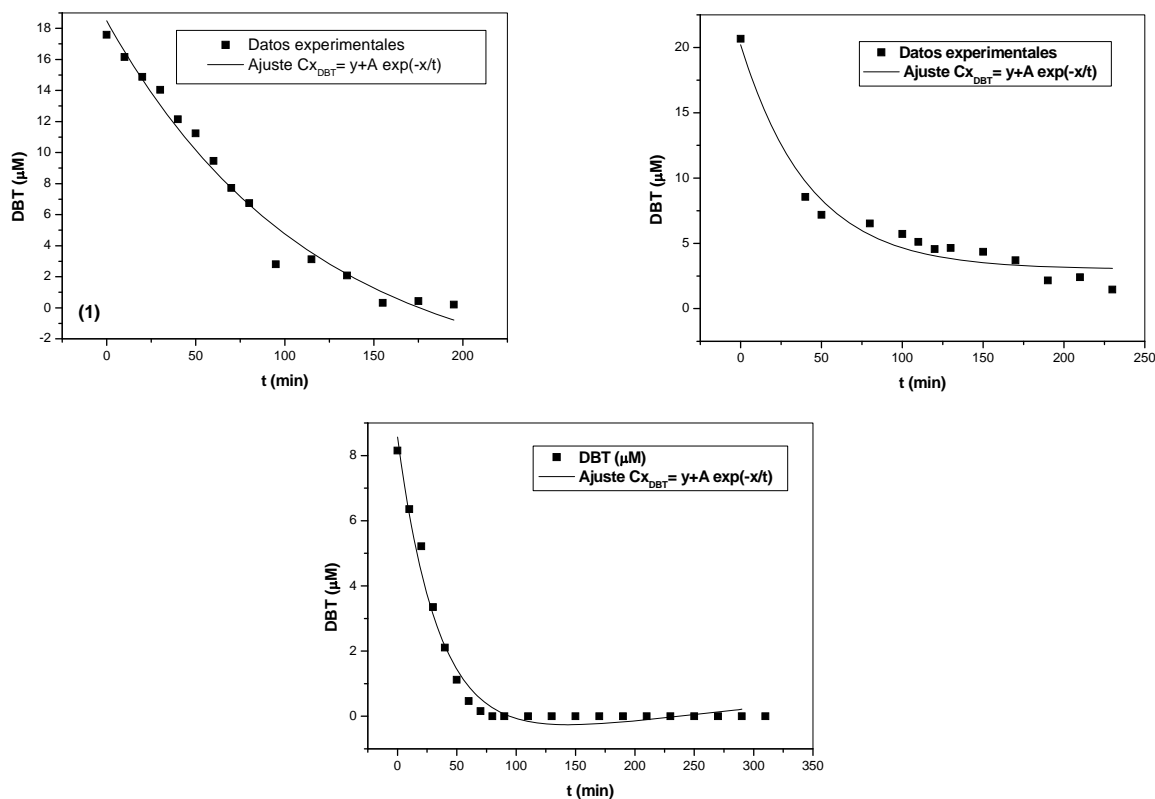
En la tabla 4.4, se muestran los parámetros estadísticos correspondientes a los ajustes realizados al aplicar el modelo cinético utilizado, para los ensayos RAE-1.1, RAE-1.2 y RAE-1.3.

EXPERIMENTO		RAE-1.1	RAE-2.1	RAE-3.1
<b>Cx<sub>0</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	-5.09 $\pm$ 2.29	0.11 $\pm$ 0.12	-1.02 $\pm$ 0.45
<b>t (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	114.61 $\pm$ 2.02	0.025 $\pm$ 0.014	34.47 $\pm$ 3.48
<b>A</b>	<b>Valor del parámetro</b>	23.59 $\pm$ 2.02	10.57 $\pm$ 0.28	9.58 $\pm$ 0.46
<b>F de Fischer</b>		512.904	827.363	353.69
<b>Valor tabulado al 95% De confianza</b>	<b>t de Student</b>	1.782	1.746	1.746
	<b>F de Fischer</b>	2.350	2.068	2.068
<b>Coefficiente de correlación</b>		0.975	0.988	0.982

**Tabla 4.4.** Parámetros estadísticos obtenidos del modelo cinético utilizado, para los ensayos en los que se han utilizado distintas concentraciones de biocatalizador, utilizando como único sustrato DBT.



La figura 4.3 muestra la evolución y el ajuste de los datos experimentales de DBT, durante el proceso de BDS para los ensayos RAE-1.1, RAE-2.1 y RAE-3.1.



**Figura 4.3. Evolución y ajuste de los datos experimentales correspondientes a DBT en los ensayos RAE-1.1 (1), RAE-2.1 (2) y RAE-3.1 (3).**

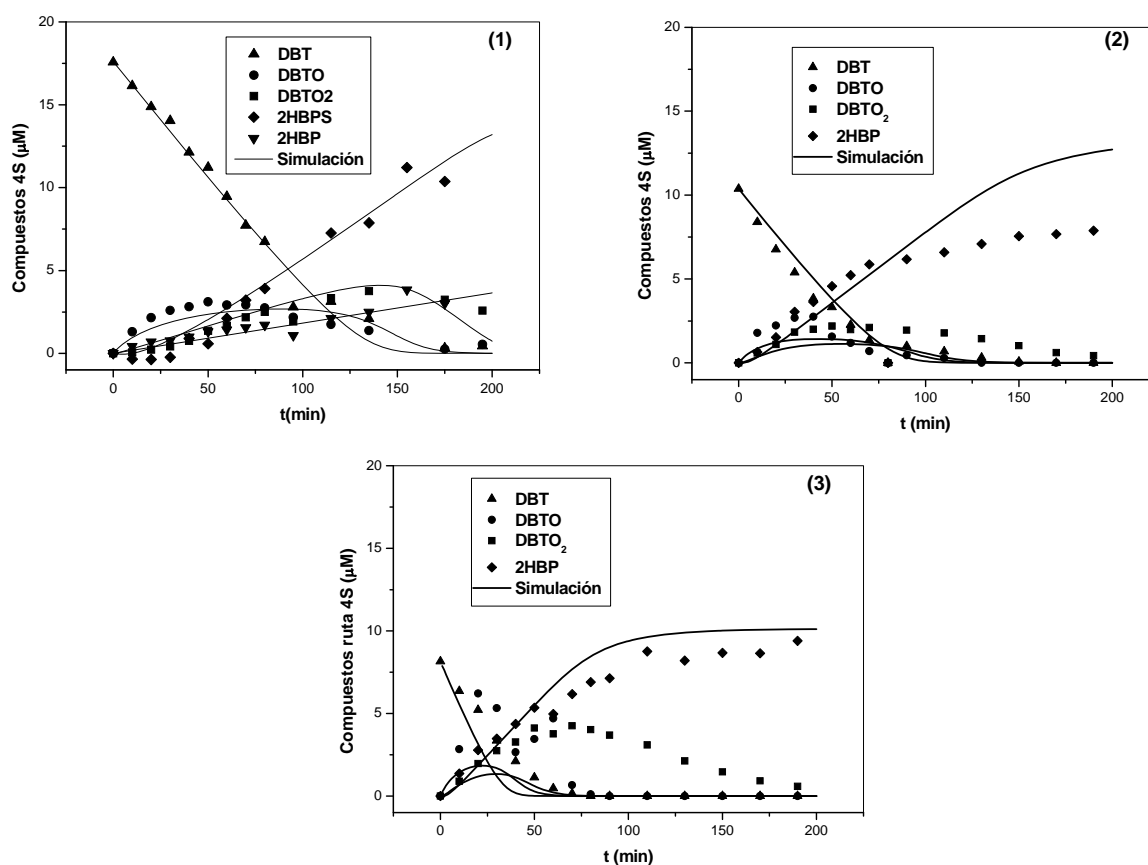
Las constantes utilizadas para simular DBT y todos los intermedios de la ruta 4S, se recogen en la siguiente tabla:

	$v_{max} (\mu\text{mol}/g_{\text{biomasa}} \text{ min})$	$K_m (\mu\text{M})$
<b>DBT</b>	0.218	1.060
<b>DBTO</b>	0.331	3.861
<b>DBTO2</b>	0.860	10.030
<b>HBPS</b>	2.211	0.739

**Tabla 4.5. Velocidades específicas máximas y valores de  $K_m$ , correspondientes a DBT y a los intermedios de la ruta 4S en condiciones acuosas de *resting cell* en medio acuoso para *P. putida* CECT5279.**

La velocidad específica máxima y la constante de Michaelis-Menten para el compuesto DBT han sido calculadas utilizando la representación de Langmuir, como se ha comentado anteriormente. Los valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  utilizados para simular el compuesto DBTO, DBTO<sub>2</sub> y HBPS, han sido tomados del trabajo de Alcón y col., 2008, correspondientes a un biocatalizador producido en un biorreactor tanque agitado de 10 horas de crecimiento para DBTO y DBTO<sub>2</sub>, y de 5 horas de crecimiento para HBPS. La constante de inhibición de 2HBP,  $K_i$ , utilizada fue de 7.936  $\mu\text{M}$ , la cual corresponde al biocatalizador de 5 horas de crecimiento.

En la figura 4.4, se muestran las simulaciones de los ensayos RAE-1.1, RAE-2.1 y RAE-3.1 utilizando los valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  de la tabla 4.5.



**Figura 4.4.** Evolución y simulación de los compuestos producidos en la biodesulfuración de DBT en condiciones de resting cell en fase acuosa de los ensayos RAE-1.1 (1), RAE-2.1 (2) y RAE-3.1 (3).

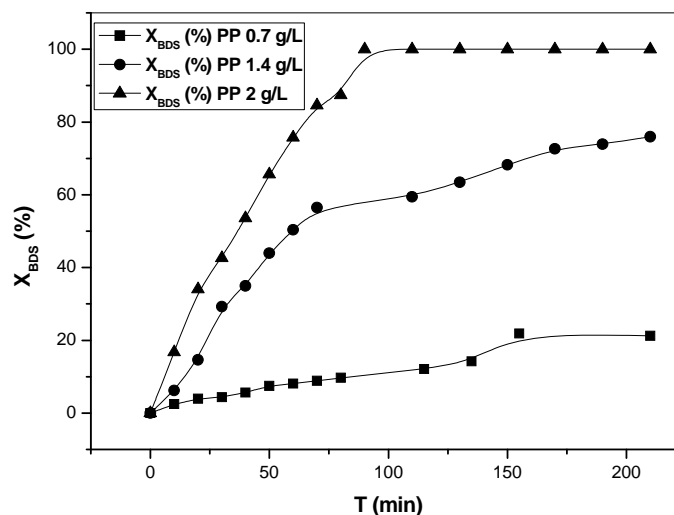
Como se puede comprobar, el modelo cinético utilizado simula de forma satisfactoria los valores experimentales de DBT y de los intermedios de la ruta 4S para el ensayo RAE-1.1. En cambio, el modelo no consigue simular de forma adecuada los valores experimentales ni de DBT, ni de los intermedios de la ruta 4S en los ensayos RAE-2.1 y RAE-3.1, en los que se ha añadido mayor cantidad de biomasa.

Este comportamiento podría deberse a la alteración producida sobre las propiedades físicas del medio de reacción, provocada por la adición de una mayor cantidad de biomasa, ya que esta va acompañada de un incremento de glicerol. El medio de reacción de la fase acuosa está constituido por tampón Hepes pH=8 y el inóculo correspondiente con una proporción distinta de glicerol, dependiendo de la concentración de biocatalizador utilizado en cada ensayo. El biocatalizador utilizado es conservado en una mezcla de solución suero salino-glicerol al 50% (v/v), lo cual implica que a mayor concentración de biomasa adicionada, la concentración de glicerol aumente en el medio de reacción, llegando a estar presente en una proporción superior al 30% (v/v) del volumen total en el caso del ensayo RAE-3.1, modificando la densidad y viscosidad del medio de forma significativa.

Estudios previos de nuestro equipo de investigación (Caro y col., 2007) concluyen que elevadas concentraciones de biocatalizador puede ser perjudicial para la reacción de BDS. Utilizando *P.putida* CECT5279 y *R. erythropolis* IGTS8 en un rango entre 1 y 32 g<sub>biomasa</sub>/L de biomasa y 25 µM de DBT, previamente disuelto en etanol, y tampón Hepes pH=8 como medio de reacción, observaron como a altas concentraciones de biomasa se producían cambios importantes en la densidad del medio de reacción, que junto al efecto de inhibición de la producción de 2HBP, producían una disminución de las velocidades de degradación específicas de DBT.

Del mismo modo, el efecto de la concentración de biocatalizador en fase orgánica, es una variable frecuentemente valorada en trabajos de biodesulfuración con células en *resting cell*, llegando a la conclusión que el rendimiento de desulfuración disminuye al aumentar la concentración de biomasa, debido a que se produce una limitación en la transferencia de DBT a la membrana celular (Finnerty y col., 1993; Maghsoudi y col., 2001; Luo y col., 2003; Jia y col., 2006).

Por otro lado, se ha obtenido la evolución de los rendimientos de desulfuración  $X_{BDS}$  a lo largo de la reacción de biodesulfuración, los cuales se muestran en la figura 4.5. De forma general se observa como al aumentar la concentración de biocatalizador, se produce un aumento notable en los porcentajes de desulfuración, siendo por tanto el ensayo RAE-3.1 en el cual se alcanzan mayores rendimientos de desulfuración, obteniéndose un valor de  $X_{BDS}$  de 100%, el cual se alcanza en torno a los 100 minutos de reacción.



**Figura 4.5. Evolución del parámetro  $X_{BDS}$  durante los ensayos realizados con distintas concentraciones de biocatalizador utilizando DBT como sustrato.**

En cambio, el rendimiento más bajo se ha obtenido en el ensayo REA-1.1, en el cual se ha utilizado 0.7 g<sub>biomasa</sub>/L de biomasa, siendo el valor de 21.20% al final de la reacción.

A pesar que en los ensayos RAE-1.1 la concentración de DBT inicial desaparece completamente, sin embargo, no llega a ser transformado en su totalidad en el compuesto final libre de azufre, 2HBP, acumulándose en el compuesto intermedio HBPS, deteniéndose el mecanismo enzimático antes de alcanzar la conversión total.

Sin embargo, en los ensayos en los que se ha utilizado mayor concentración de biocatalizador, RAE-2.1 y RAE-3.1, no se ha observado acumulación de HBPS, por lo que se considera que el balance de materia se consigue cerrar, debido a que la conversión de DBT a 2HBP es prácticamente total en ambos ensayos.

Por otro lado, la disparidad de las concentraciones iniciales de DBT en los ensayos realizados, puede ser debida a la aparición de cristales sólidos del compuesto no disueltos, cuyo límite de solubilidad es de 5  $\mu\text{M}$  en medios acuosos (Maghsoudi y col., 2001), por lo tanto es otro factor a tener en cuenta, más aún debido a que todos los ensayos se han llevado a cabo utilizando concentraciones superiores a dicho límite.

Según el autor Honda y col., 1998, el error habitual asociado al muestreo, se puede acentuar en el caso de DBT, debido a que se trata de un compuesto de alta hidrofobicidad, el cual es muy difícil extraer de la superficie celular o de la cara interna de los tubos de muestreo. Para disminuir este problema en nuestros ensayos, se ha procedido adicionando previamente una cantidad del mismo volumen de acetonitrilo en cada Eppendorf utilizado para recoger la muestra.

#### ***4.3.1.2. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase orgánica para DBT***

Como se ha comentado en el apartado 4.2.2, la obtención de las constantes cinéticas de DBT y de 2HBP se ha llevado a cabo utilizando el método integral. En primer lugar, se realizó el ajuste a la ecuación 4.17 y posteriormente se resolvió la ecuación 4.21 por el método integral utilizando los datos teóricos para minimizar las desviaciones, y por último se obtuvieron los correspondientes valores de  $K_{\text{Cx-DBT}}$  por regresión lineal. Los datos del ajuste correspondiente a DBT se muestran en la tabla 4.6.

<b>EXPERIMENTO</b>		<b>RBE-1</b>
<b>Cx<sub>0</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	56.48 $\pm$ 2.68
<b>t (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	155.57 $\pm$ 6.09
<b>A</b>	<b>Valor del parámetro</b>	57.29 $\pm$ 2.35
<b>F de Fischer</b>		16333.39
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	1.85
	<b>F de Fischer</b>	1.63
<b>Coefficiente de correlación</b>		0.99

**Tabla 4.6. Parámetros del ajuste de los datos experimentales, obtenidos para el ensayo RBE-1.**

Por otro lado, no se han encontrado concentraciones significativas del resto de intermedios implicados en la ruta 4S en la fase orgánica. Según Yang y Marison, 2005, en los ensayos en sistemas bifásicos no se produce la acumulación de intermedios de la ruta 4S en el interior celular como en el caso de los sistemas acuosos.

Algunos autores, asumen que en sistemas bifásicos el compuesto DBT es metabolizado estequiométricamente a 2HBP (Luo y col., 2003). En cambio, en nuestro trabajo puede observarse como no se consigue cerrar el balance de materia sólo con las concentraciones correspondientes a DBT y 2HBP. Por tanto, la diferencia de concentraciones podría deberse a la acumulación de los productos intermedios de la ruta 4S en la fase acuosa, los cuales no han podido ser cuantificados de manera satisfactoria debido a la interferencia producida en la medida por la presencia de Tween 85.

En la tabla 4.7 se recogen los valores de la constante cinética de DBT y 2HBP.

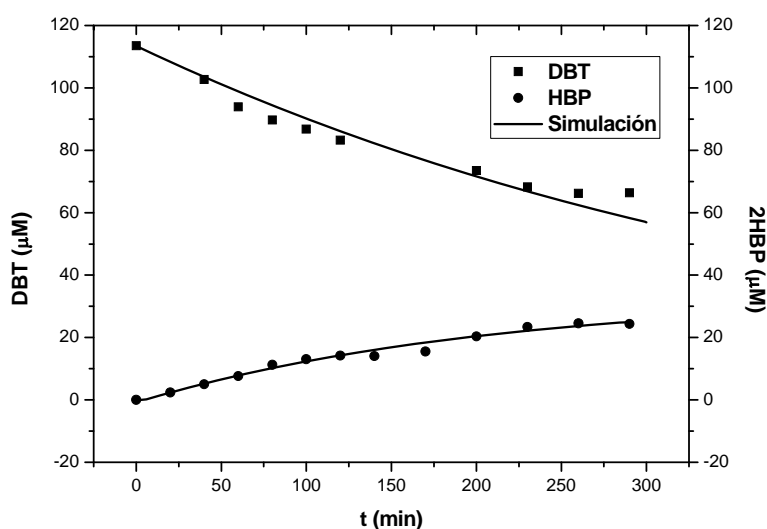
	$v_o (\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}) \cdot 10^2$	$K (\text{min}^{-1}) \cdot 10^3$
<b>DBT</b>	2.10	2.65
<b>HBP</b>	1.80	4.79

**Tabla 4.7. Valores de las velocidades iniciales de desaparición de DBT y de aparición de 2HBP, así como de sus correspondientes coeficientes de transferencia de materia en el ensayo RBE-1.**

Por otra parte, Caro y col., 2008, obtuvieron los valores de la constante cinética para DBT y 2HBP, utilizando como biocatalizador *P. putida* CECT5279, en condiciones de *resting cell* en medio bifásico. En cambio, los valores obtenidos de  $K_{\text{DBT}}$  y  $K_{\text{HBP}}$  son bastante más bajos que los obtenidos en este trabajo, obteniendo valores de  $4.80 \cdot 10^{-4}$  y  $8.50 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  respectivamente. Sin embargo, los ensayos realizados por Caro y col., 2008, presentan diferencias respecto a los llevados a cabo en nuestro trabajo. La fase acuosa estaba formada por 1 g<sub>biomasa</sub>/L de biocatalizador en Hepes pH=8 y la fase orgánica estaba constituida por 271  $\mu\text{M}$  de DBT disuelto en hexadecano en proporción 1:1, y en el cual no se añadió ningún surfactante adicional. El biocatalizador utilizado fue producido en tanque agitado y fue recogido a las 5 horas de crecimiento, por lo que la capacidad de desulfuración es distinta a la del biocatalizador utilizado en este trabajo.

Por otro lado, se ha obtenido la velocidad inicial de producción específica de 2HBP y la velocidad específica inicial de degradación de DBT, siendo de  $1.80 \cdot 10^{-2}$  y  $2.10 \cdot 10^{-2}$  de  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$  respectivamente, y el rendimiento de desulfuración ( $X_{\text{BDS}}$ ) obtenido fue de 36.73 % a los 300 minutos de reacción.

La figura 4.6 recoge la evolución de los valores de concentración durante la degradación de DBT y de la producción del compuesto libre de azufre 2HBP en el ensayo RBE-1.



**Figura 4.6. Evolución de la degradación de DBT y de la formación de 2HBP en el ensayo RBE-1.**

De los trabajos que se han encontrado en la literatura, en los que se ha realizado el estudio cinético del proceso de biodesulfuración de DBT en condiciones bifásicas, utilizando distintas cepas en agitador orbital, hay que destacar el trabajo realizado por Luo y col. (2003). Dichos autores trabajaron a escala de agitador orbital en condiciones bifásicas, donde la fase acuosa estaba compuesta por  $20 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{L}$  de *Pseudomonas delafieldii* R-8,  $0.85 \text{ g/L}$  NaCl,  $0.1 \text{ M}$  de buffer fosfato a  $\text{pH}=7$  y SFM, y el medio orgánico estaba formado por  $10 \text{ mM}$  DBT disuelto en dodecano en el cual el ratio fase acuosa-orgánica era de 1.0. El grado de conversión a las 18 horas fue de 97%, obteniendo una velocidad de degradación de  $11.4 \text{ mM/min Kg}_{\text{biomasa}}$  y una  $K_m$  de  $1.3 \mu\text{M}$ . El grado de conversión en este trabajo es muy elevado pero es probablemente debido a la gran cantidad de biocatalizador empleado.

**4.3.1.3. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase acuosa para DBT**

Para realizar el estudio cinético de desulfuración de DBT en condiciones acuosas en *resting cell* en tanque agitado, se han seguido los mismos pasos que en el caso de los ensayos realizados en agitador orbital, anteriormente descritos, para los cuales se ha utilizado el modelo cinético de Michaelis-Menten.

Las constantes cinéticas que van a describir el proceso de conversión de DBT y de los intermedios de la ruta 4S, pertenecientes al ensayo RAT-1, se muestran en la siguiente tabla:

	$v_{max} (\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \text{ min})$	$K_m (\mu\text{M})$
<b>DBT</b>	0.950	1.060
<b>DBTO</b>	0.331	3.861
<b>DBTO<sub>2</sub></b>	2.471	10.471
<b>HBPS</b>	0.315	7.692

**Tabla 4.8. Valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  obtenidos para DBT y los intermedios de la ruta 4S en el ensayo RAT-1.**

Las velocidades específicas máximas correspondientes a la desaparición de DBT se han obtenido utilizando la representación de Langmuir y las velocidades específicas que describen la evolución de los datos experimentales de los intermedios de la ruta 4S, han sido tomadas del trabajo de Alcón y col, 2008.

Los valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  utilizados corresponden a un biocatalizador producido en tanque agitado, con edades de crecimiento variables entre 10 y 23 horas. Las velocidades específicas tomadas para DBTO corresponden a un biocatalizador de 10 horas de crecimiento, y las correspondientes a DBTO<sub>2</sub> y HBPS corresponden a un biocatalizador de 23 horas de crecimiento, así como la constante de inhibición,  $K_i$ , para el 2HBP, con un valor de  $1.061 \cdot 10^2 \mu\text{M}$ .

Como se puede deducir de estos resultados, la velocidad específica máxima para DBT, es muy superior a las obtenidas en los ensayos realizados a escala de agitador



orbital, siendo de  $0.950 \mu\text{M}/\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$  en tanque agitado, frente a  $0.218 \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}}$  obtenido en agitador orbital.

El valor de  $K_m$  se mantiene constante tanto en los ensayos en agitador orbital como en los ensayos en tanque agitado, de lo que se deduce que es independiente de la escala de trabajo, y que depende únicamente de la naturaleza del biocatalizador.

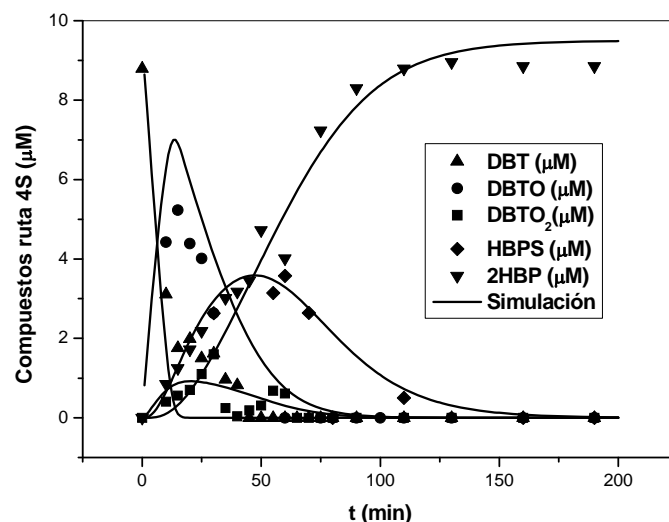
En el caso de los intermedios de la ruta 4S, para DBTO se utilizaron las mismas constantes cinéticas que en la escala de agitador orbital. En cambio, para DBTO<sub>2</sub> la velocidad específica máxima corresponde a un biocatalizador de 10 horas en agitador orbital, y de 23 horas en tanque agitado, produciéndose la conversión más rápidamente en tanque agitado, y donde el valor de  $K_m$  es muy similar en ambos casos.

En el caso de HBPS, la velocidad específica máxima utilizada en agitador orbital es mayor que en tanque agitado, correspondiendo las constantes cinéticas máximas para un biocatalizador de 5 y 23 horas respectivamente, y donde el valor de  $K_m$  es muy inferior en el caso del agitador orbital.

Por otra parte, la constante de inhibición de HBPS es muy superior en el caso de utilizar tanque agitado, ya que como se ha comentado, esta constante ha sido tomada para un biocatalizador de 23 horas, frente a la tomada en el agitador orbital que le correspondía a una edad de crecimiento de 5 horas.

Una de las razones que pueden influir en el proceso de biodesulfuración, y que pueden afectar a la velocidad de conversión de DBT, es el aporte continuo de oxígeno al medio a lo largo de toda la reacción, el cual puede mejorar la transferencia de materia de forma conjunta con el mecanismo de agitación mecánica y facilitar la puesta en contacto del sustrato con el microorganismo, produciendo una mejora sustancial en la velocidad de desulfuración. Asimismo, tampoco se deben descartar la influencia del aporte de oxígeno en otros procesos metabólicos que puedan favorecer la ruta 4S.

La evolución y simulación de los valores experimentales correspondientes a los valores de DBT y de los intermedios de la ruta 4S se muestran en la figura 4.7.



**Figura 4.7.** Evolución y simulación de la degradación de DBT y de los intermedios de la ruta 4S en el ensayo RAT-1.

Como puede apreciarse en la figura 4.7, la degradación de DBT es muy rápida, llegando a convertirse totalmente antes de los 50 minutos de reacción. También puede comprobarse, como la aparición y desaparición de todos los intermedios de la ruta 4S se produce de forma rápida, produciéndose estequiométricamente el producto libre de azufre, 2HBP.

Por otra parte, el rendimiento de desulfuración en tanque agitado es de 100 %, frente al 21.2% a tiempo obtenido en los ensayos realizados en agitador orbital al final de la reacción, con el mismo biocatalizador y de la misma edad celular.

Además, las velocidades específicas de degradación obtenidas para DBT, son seis veces superiores a las obtenidas en agitador orbital, por lo que la reacción de biodesulfuración estará mucho más favorecida en tanque agitado. El efecto del aporte continuo de oxígeno durante la reacción de *resting cell* en medio acuoso favorece la conversión de DBT a 2HBP, ya que va a permitir satisfacer las necesidades de oxígeno en la reacción de biodesulfuración. Por otra parte, también va a mejorar el contacto entre el microorganismo y el DBT, favoreciendo su entrada la interior celular.

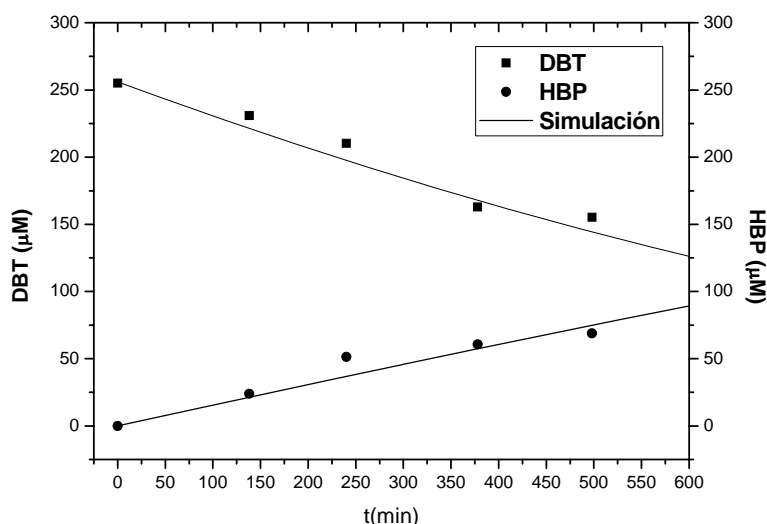
#### **4.3.1.4. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase orgánica para DBT**

La obtención de las constantes cinéticas de DBT y 2HBP para los ensayos en tanque agitado se ha obtenido utilizando el método cinético descrito en el apartado 4.3.1.2.

Como ocurría en los ensayos realizados a escala de agitador orbital, no se han detectado concentraciones significativas de los intermedios de la ruta 4S en la fase orgánica, pudiéndose cuantificar el producto libre de azufre, 2HBP.

Se cree que el resto de productos intermedios formados en la reacción de biodesulfuración necesarios para cerrar el balance, se encuentran en la fase acuosa, sin embargo, como se ha comentado anteriormente, no ha sido posible cuantificar satisfactoriamente los productos en dicha fase, debido a que en la reacción se ha añadido Tween 85 y se ha comprobado que interfiere en la medida.

La figura 4.8 muestra la evolución de los valores correspondientes a las concentraciones de degradación de DBT y de producción de 2HBP a lo largo de la reacción de desulfuración del ensayo RBT-1 y en la que puede verse que la conversión de DBT y la formación de 2HBP es prácticamente equimolecular.



**Figura 4.8. Evolución y simulación de la degradación de DBT y producción de HBP en el ensayo RBT-1.**

Los parámetros cinéticos obtenidos para la reacción de biodesulfuración de DBT y 2HBP, se muestran en la tabla 4.9.

	$v_o (\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min})\cdot 10^2$	$K (\text{min}^{-1})\cdot 10^3$
<b>DBT</b>	1.17	1.07
<b>HBP</b>	1.15	5.87

**Tabla 4.9.** Valores de las velocidades iniciales de desaparición de DBT y de aparición de 2HBP, así como de los coeficientes de transferencia de materia en el ensayo RAT-1.

Las constantes cinéticas para DBT y 2HBP obtenidos en el ensayo RAT-1, fueron de  $1.07\cdot 10^{-3}$  y de  $5.87\cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  respectivamente. Como puede comprobarse, los valores de  $K_{\text{DBT}}$  difieren de manera significativa en tanque agitado y en agitador orbital, y siendo más parecidos en el caso de  $K_{\text{HBP}}$ . Por otra parte, se obtiene un rendimiento de conversión similar en tanque agitado y en agitador orbital, siendo de 38.00 y a 41.51 % respectivamente.

A pesar de que se mejora el transporte al utilizar tanque agitado, este efecto se contrarresta con el estrés producido por la agitación mecánica sobre el microorganismo, limitando el tiempo de vida del biocatalizador, y al cual hay que sumar el efecto tóxico producido por la presencia de la fase orgánica en la proporción de trabajo y de la presencia de Tween 85. Este estrés no se produce al trabajar a escala de Erlenmeyer, ya que la agitación es orbital, y es mucho menos agresiva con el biocatalizador.

Hay que tener en cuenta que no se ha utilizado la misma cantidad de microorganismo en los ensayos realizados a escala de agitador orbital y en tanque agitado. Por esta razón, para comparar los rendimientos de desulfuración obtenidos ente ambas escalas de trabajo, ha sido necesario determinar su capacidad desulfurante específica, la cual se representa por la siguiente ecuación:

$$D'_{\text{BDS}} = \frac{X_{\text{BDS}}}{C_x} \quad (4.22)$$

Los valores de  $D'_{\text{BDS}}$  obtenidos para tanque agitado son superiores a los obtenidos a escala de agitador orbital, obteniéndose valores de 2.98 y 2.15 %·L/  $\text{g}_{\text{biomasa}}$

respectivamente. Estos resultados demuestran que la reacción de desulfuración esta mucho más favorecida a escala de tanque agitado. Esto es debido principalmente a que se mantiene una constante aportación de aire al medio durante toda la reacción, facilitando el mantenimiento del microorganismo y cubriendo las necesidades de oxígeno en el proceso de desulfuración.

De la misma manera, el efecto conjunto de la agitación mecánica y de la aireación mejora el contacto entre la fase acuosa, donde se encuentra el microorganismo y la fase orgánica, donde se encuentra disuelto el DBT, mejorando su transporte hasta al interior celular, y por tanto facilitando la reacción de desulfuración.

#### ***4.3.2 Estudio cinético de la biodesulfuración de Cx-DBT***

##### ***4.3.2.1. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase acuosa para Cx-DBT***

#### **Proceso de biodesulfuración de Cx-DBT como único sustrato**

Para obtener las constantes cinéticas de los derivados alquilados, 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT, se ha procedido del mismo modo que con el compuesto DBT.

En primer lugar se realizó el ajuste a una ecuación de tipo exponencial (ecuación 4.17), para de ese modo minimizar los problemas causados por la desviación de los datos experimentales.

Posteriormente, para llevar a cabo la obtención de  $v_{max}$  y  $K_m$ , se ha utilizado la representación de Langmuir, ya que como se había visto anteriormente para el DBT, era la representación que mejor se ajustaba a los datos experimentales.

En la figura 4.9 se muestran los ajustes a la ecuación 4.17 realizados para los ensayos RAE-1.1, RAE-1.2, RAE-1.3 y RAE-1.4, procediéndose posteriormente del mismo modo que para el compuesto DBT en el apartado anterior.

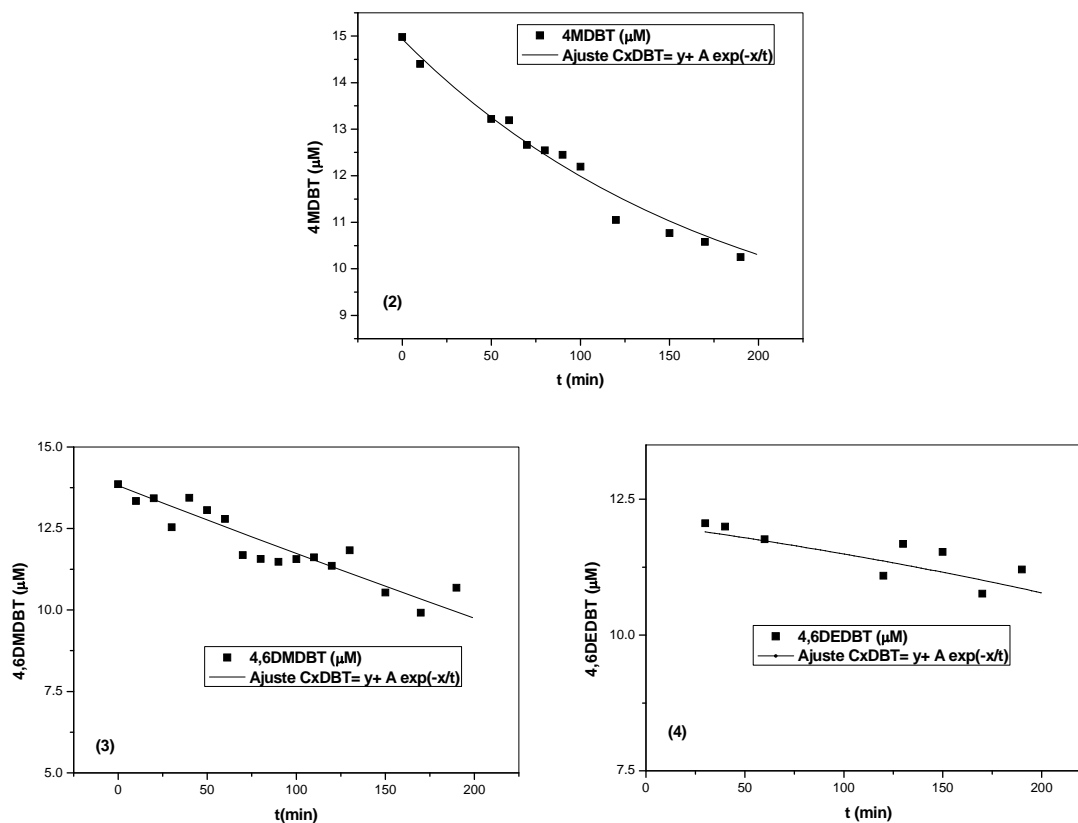


Figura 4.9. Ajustes realizados para los ensayos RAE-1.2, RAE-1.3 y RAE-1.4.

Los valores estadísticos de los ajustes de los datos experimentales realizados para cada ensayo, correspondiente a cada Cx-DBT, se muestran en las tablas 4.10, 4.11 y 4.12.

EXPERIMENTO		RAE-1.2	RAE-2.2	RAE-3.2
Cx <sub>0</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Valor del parámetro	6.95 $\pm$ 0.91	4.36 $\pm$ 0.41	-0.31 $\pm$ 0.29
t ( $\text{min}^{-1}$ )	Valor del parámetro	229.31 $\pm$ 43.16	110.22 $\pm$ 10.6	64.53 $\pm$ 5.99
A	Valor del parámetro	7.95 $\pm$ 0.85	10.20 $\pm$ 0.37	12.47 $\pm$ 0.47
F de Fischer		19719.914	4901.40	426.99
Valor tabulado al 95% de confianza	t de Student	1.782	1.746	1.734
	F de Fischer	2.350	2.068	1.978
Coeficiente de correlación		0.987	0.985	0.972

Tabla 4.10. Parámetros estadísticos calculados en el ajuste exponencial de los datos de los experimentos de 4MDBT en los que se han utilizado distintas concentraciones de biocatalizador.

EXPERIMENTO		RAE-1.3	RAE-2.3	RAE-3.3
<b>Cx<sub>0</sub> (μM)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	22.58±7.30	14.06±1.16	4.66±1.28
<b>t (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	-589.13±386.59	164.89±74.02	195.85±57.15
<b>A</b>	<b>Valor del parámetro</b>	-8.80±7.19	-1.17±1.01	8.33±1.18
<b>F de Fischer</b>		10749.98	2971.98	2383.33
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	1.771	2.132	1.812
	<b>F de Fischer</b>	2.261	5.664	2.588
<b>Coefficiente de correlación</b>		0.973	0.966	0.969

**Tabla 4.11.** Parámetros estadísticos calculados en el ajuste exponencial de los datos de los experimentos de 4,6DMDBT en los que se han utilizado distintas concentraciones de biocatalizador

EXPERIMENTO		RAE-1.4	RAE-2.4	RAE-3.4
<b>Cx<sub>0</sub> (μM)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	10.42±0.10	6.82±0.95	11.44±0.15
<b>t (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor del parámetro</b>	38.62±4.42	179.27±45.18	312.38±12.38
<b>A</b>	<b>Valor del parámetro</b>	3.71±0.19	7.04±0.86	21.39±0.14
<b>F de Fischer</b>		12048.13	5348.79	184.98
<b>Valor tabulado al 95% de confianza</b>	<b>t de Student</b>	1.833	1.782	2.132
	<b>F de Fischer</b>	2.756	2.350	5.664
<b>Coefficiente de correlación</b>		0.971	0.965	0.959

**Tabla 4.12.** Parámetros estadísticos calculados en el ajuste exponencial de los datos de los experimentos de 4,6DEDBT en los que se han utilizado distintas concentraciones de biocatalizador

En la tabla 4.13 se recogen los valores obtenidos de las constantes cinéticas obtenidas por la representación de Langmuir para los ensayos realizados variando la concentración de biocatalizador.

	X	RAE-1.X		RAE-2.X		RAE-3.X	
		$v_{max}$	$K_m$	$v_{max}$	$K_m$	$v_{max}$	$K_m$
DBT	1	0.218	1.06	0.109	1.06	0.076	1.06
4MDBT	2	0.154	14.08	0.089	22.91	0.062	38.34
4,6DMDBT	3	0.073	13.98	0.037	19.64	0.042	26.55
4,6DEDBT	4	0.028	18.11	0.042	18.11	0.029	18.10

$v_{max}$  :  $\mu\text{mol}/\text{min g}_{\text{biomasa}}$ ;  $K_m$ :  $\mu\text{M}$

**Tabla 4.13.** Valores de  $v_{max}$  y de  $K_m$  obtenidos utilizando la representación de Langmuir correspondientes a DBT y a sus derivados alquilados, Cx-DBT, en los ensayos en *resting cell* en fase acuosa en los cuales se han utilizado distintas concentraciones de biocatalizador.

Si se comparan las  $v_{max}$  para DBT y Cx-DBT para una misma concentración de biocatalizador, se observa como el valor de  $v_{max}$  disminuye al aumentar el número de carbonos del sustituyente en el anillo aromático en el compuesto Cx-DBT, siendo este efecto independiente de la concentración de biocatalizador utilizado. Del mismo modo, el valor de  $K_m$  se hace mayor al aumentar el número y tamaño de los sustituyentes en el anillo aromático, provocando una disminución de la afinidad para ser metabolizados por el biocatalizador.

En el caso que se comparen los valores de  $v_{max}$  para DBT y Cx-DBT para los ensayos realizados a distinta concentración de biocatalizador, se observa de forma general como al aumentar la concentración de biocatalizador se produce una disminución del valor de  $v_{max}$ . En cambio, el valor de  $K_m$  se mantiene constante para DBT, pero sin embargo, para 4MDBT, 4,6DMDBT y para 4,6DEDBT, este va a aumentar con la concentración de bacteria utilizada.

Este efecto puede quedar explicado del mismo modo que en el caso de DBT, ya que al aumentar la concentración de biocatalizador se están modificando las condiciones físicas del medio de reacción al incrementar la cantidad de glicerol, lo que al parecer es perjudicial para el proceso.

En la figura 4.10, se muestra la evolución y simulación de los datos experimentales, utilizando el modelo cinético propuesto, para DBT y Cx-DBT en los ensayos en los cuales se ha modificado la concentración de biocatalizador.



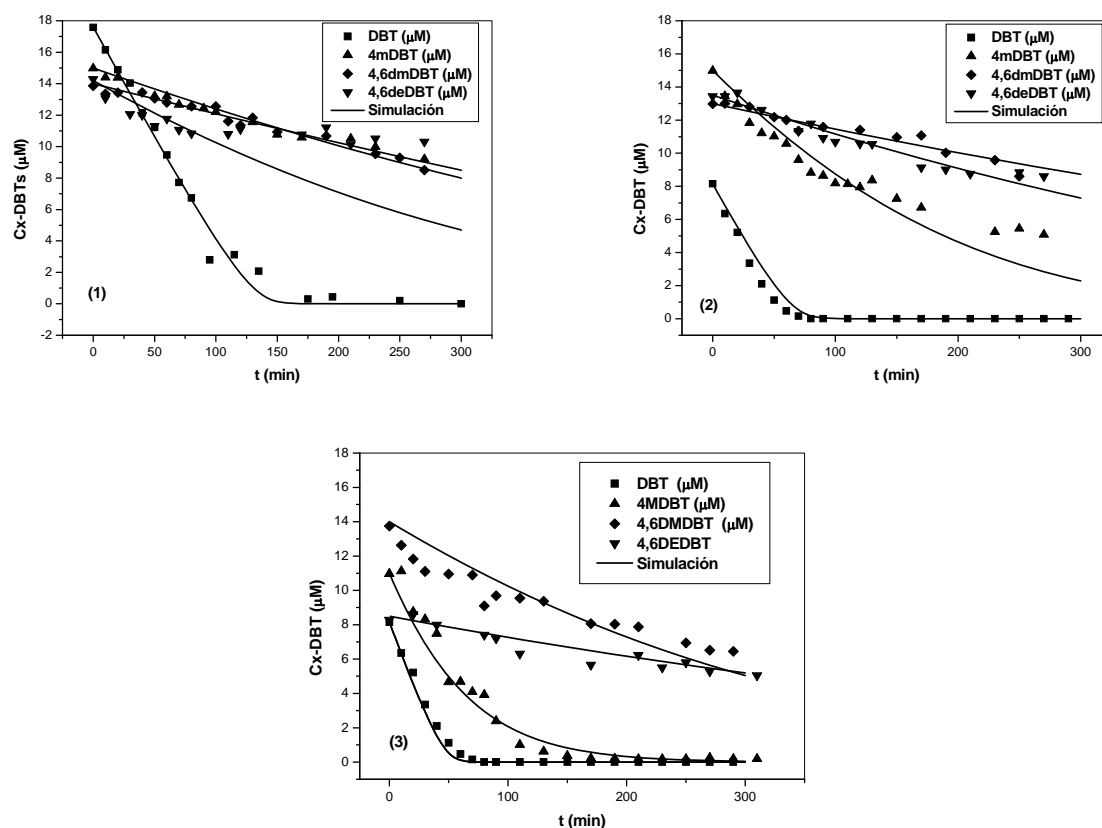


Figura 4.10. Evolución de los compuestos Cx-DBTs en los ensayos con distinta concentración de biocatalizador: (1) 0.7 g/L; (2) 1.4 g/L y (3) 2 g/L.

Por otra parte, se han determinado los rendimientos de conversión,  $Y_{BDS}$ , obtenidos para los todos los ensayos donde se han utilizado DBT y Cx-DBT con distintas concentraciones de biocatalizador, los cuales se recogen en la tabla 4.14.

		RAE-1.X	RAE-2.X	RAE-3.X
	X	$Y_{BDS}$ (%)	$Y_{BDS}$ (%)	$Y_{BDS}$ (%)
DBT	1	98.84	94.36	100
4MDBT	2	29.87	38.14	98.09
4,6DMDBT	3	22.94	40.95	42.69
4,6DEDBT	4	21.50	32.88	41.27

Tabla 4.14. Rendimientos de conversión obtenidos para DBT y Cx-DBTs a los 200 min de reacción en los ensayos en condiciones de *resting cell* en fase acuosa, utilizando distintas concentraciones de biocatalizador.

Los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$  van a disminuir conforme aumenta el número y longitud de los sustituyentes alquilados. Según algunos autores (Folsom y col., 1999; Kobayashi y col., 2000) al aumentar el número de sustituyentes en el anillo aromático, aumenta el tamaño de la molécula. Este hecho produce que se dificulte el

contacto entre el compuesto alquilado con la superficie celular bacteriana disminuyendo la reactividad. Por otro lado, la reactividad no va a depender tanto de la posición que ocupe el sustituyente en el anillo aromático y los posibles impedimentos estéricos que se puedan producir (Osaka y col., 2001).

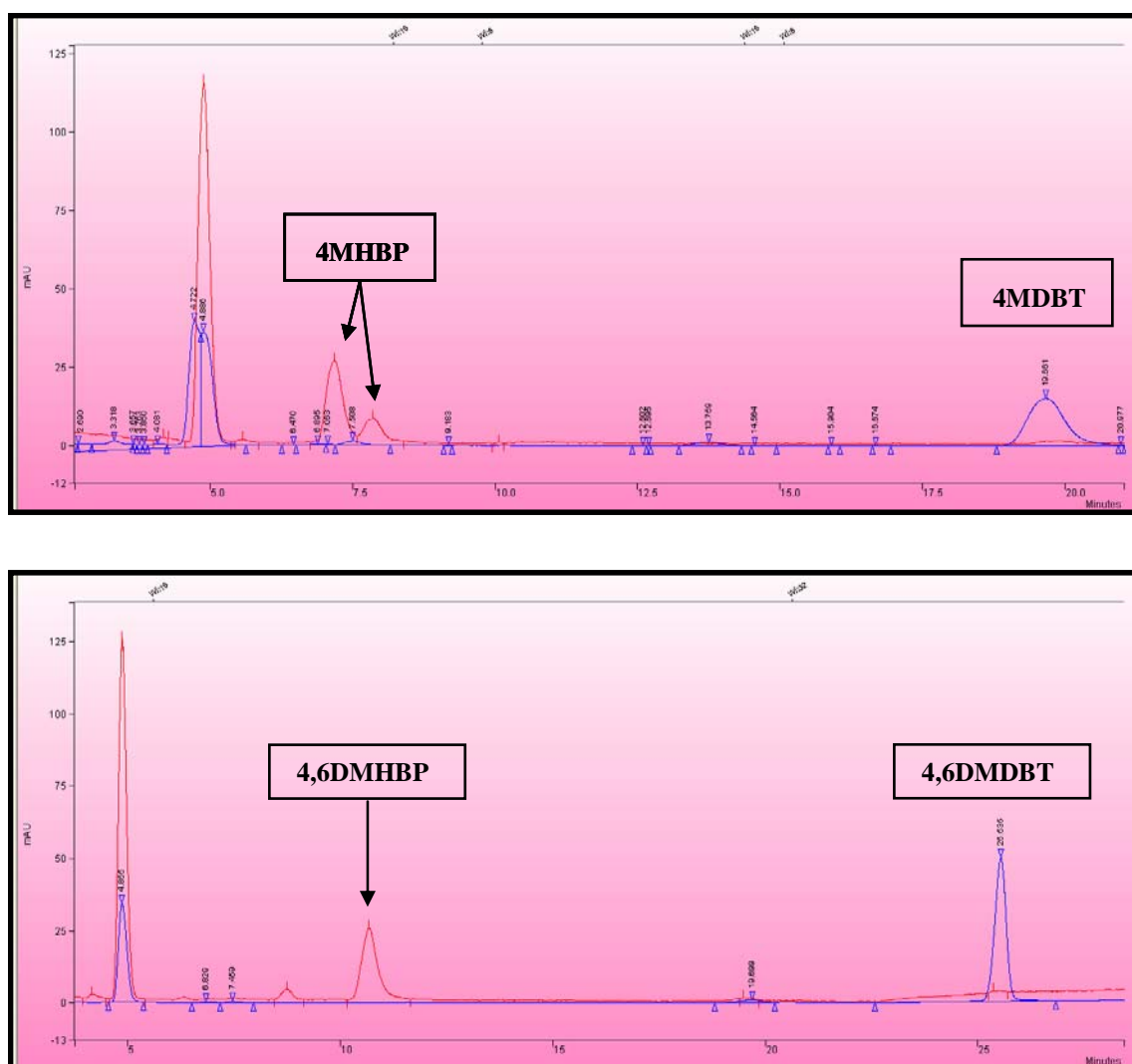
La reactividad de los compuestos Cx-DBT y por tanto el grado de conversión para los ensayos realizados, es independientemente de la concentración de biocatalizador empleado y sigue el orden que se muestra a continuación, estando directamente relacionado con el número y tamaño de los sustituyentes existentes:



Por otro lado, se puede observar como para un mismo compuesto Cx-DBT, al aumentar la concentración de biocatalizador, se produce un aumento del rendimiento de conversión, a pesar de que los valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  respectivos disminuyan. Se alcanzan rendimientos más altos a una menor velocidad, debido a la presencia de una mayor cantidad de biomasa, que permite metabolizar en mayor medida el sustrato.

Los intermedios correspondientes de la ruta 4S para todos los Cx-DBT no han podido ser cuantificados debido a que no existen patrones comerciales en el mercado y por tanto no se han podido calibrar. En cambio, si se ha detectado la presencia de picos que iban aumentando a lo largo de la reacción de biodesulfuración y cuyos espectros eran muy similares a 2HBP, por lo que se cree que deberían corresponder a los respectivos productos finales Cx-HBP.

En el caso de 4MDBT, el compuesto puede ser atacado por el microorganismo por los dos carbonos contiguos al átomo de azufre, de modo, que van a poder formarse dos isómeros, con tiempos de retención similares. Ambos picos han sido detectados, ya que poseían un espectro muy similar al de 2HBP, pero no se han podido cuantificar exactamente por HPLC-DAD. En el caso de 4,6DMDBT y de 4,6DEDBT, tan sólo ha sido detectado un compuesto libre de azufre. En la figura 4.11, se muestra el correspondiente cromatograma para los ensayos RAE-3.2 y RAE-3.3.



**Figura 4.11.** Cromatogramas correspondientes al ensayo RAE-3.2 y RAE-3.3, en el cual pueden observarse los picos iniciales correspondiente a 4MDBT y 4,6DMDBT (en azul, medido a 239 nm) y los picos correspondientes a los productos finales libres de azufre, formados por la mezcla de isómeros 4MHBPy 4,6DMHBP (en rojo, medido a 210 nm)

### Proceso de biodesulfuración de mezclas de Cx-DBT

Una vez descrita la cinética de DBT y Cx-DBT individualmente en condiciones de *resting cell* en fase acuosa, se realizó el estudio cinético de una mezcla compuesta por 10  $\mu$ M de cada uno de los compuestos Cx-DBT (DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT) disueltos previamente en etanol, en tampón Hepes pH=8 y 4.2 g/L de biocatalizador, manteniéndose así la relación concentración de compuesto y biomasa respecto de los ensayos individuales. Las condiciones de operación fueron las habituales: 30°C de temperatura, 250 rpm de agitación y 5 horas de reacción.

Los parámetros cinéticos correspondientes a cada compuesto Cx-DBT, han sido obtenidos utilizando la ecuación de Michaelis-Menten y cuyas constantes cinéticas  $v_{max}$  y  $K_m$  se han calculado a través de la representación de Langmuir, del mismo modo que en ensayos anteriores. Los resultados de los parámetros cinéticos se recogen en la tabla 4.15.

	RAE-M		
	$Y_{BDS}$ (%) (t= 200 min)	$v_{max}$	$K_m$
DBT	100	0.0188	0.800
4MDBT	96.70	0.0158	0.800
4,6DMDBT	90.87	0.0188	0.800
4,6DEDBT	6.36	0.00108	0.800

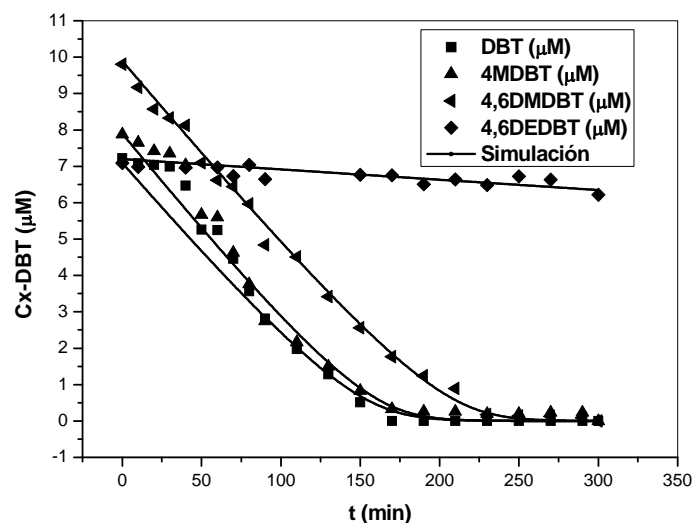
$v_{max}$  :  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min}$ ;  $K_m$ :  $\mu\text{M}$

**Tabla 4.15.** Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ ,  $v_{max}$  y  $K_m$  obtenidos para el ensayo RAE-M, en condiciones de resting cell en fase acuosa.

A partir de los valores recogidos en la tabla 4.15, se puede observar que los valores de  $v_{max}$ , no difieren de manera significativa entre DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT, siendo del mismo orden. En cambio, el valor de  $v_{max}$  de 4,6DEDBT es mucho menor que para el resto de compuestos presentes en la mezcla de reacción, siendo de un orden inferior, y este hecho, junto a su baja conversión, demuestran la dificultad de *P. putida* CECT5279 para metabolizar este compuesto. En primer lugar, este comportamiento puede explicarse por la alta hidrofobicidad del compuesto, siendo el más hidrófobo de todos los compuestos utilizados. Por otra parte, es posible que el sistema enzimático del biocatalizador no reconozca de forma selectiva el enlace C-S de la estructura del compuesto azufrado, debido a la presencia de sustituyentes etilo en la posiciones 4 y 6 del anillo aromático (Onaka y col., 2001), al cual puede sumarse el efecto por impedimento estérico (Lee y col., 1995; Lu y col., 1999). Sin embargo, todos los compuestos ensayados poseen el mismo valor de  $K_m$ , esto indica que todos los compuestos poseen la misma afinidad de ser metabolizados por el biocatalizador.

La figura 4.12 muestra la evolución y simulación de los valores experimentales de las concentraciones de los compuestos utilizados en las mezclas. En dichos ensayos se puede observar como los compuestos DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT son metabolizados, de modo que su concentración disminuye con el tiempo, hasta alcanzar

su total conversión al final de la reacción. En el caso de 4,6DEDBT apenas hay conversión, por lo que su concentración apenas disminuye con el tiempo.



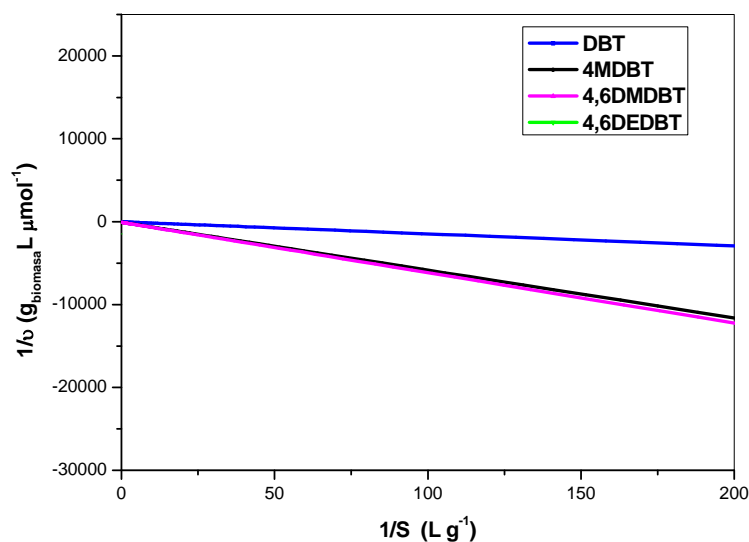
**Figura 4.12.** Evolución y simulación de los valores experimentales y predicción del modelo de los compuestos Cx-DBT utilizados en el ensayo RAE-M.

Para realizar la simulación de los valores experimentales de los compuestos Cx-DBT en la mezcla, ha sido necesario calcular los parámetros cinéticos correspondientes a cada uno de ellos, debido a que no se han podido simular utilizando las constantes cinéticas de los compuestos individuales, siendo mucho más elevadas, a pesar de mantenerse la relación entre la concentración de compuesto y de biomasa. Por lo tanto, la mezcla de compuestos Cx-DBT afecta a la velocidad de degradación de los derivados alquilados Cx-DBT, las cuales disminuyen de forma significativa en el caso de los compuestos presentes en la mezcla respecto de los ensayos individuales.

A pesar de que Kobayashi y col., 2001, asumen que el proceso de biodesulfuración de una mezcla compuesta por derivados alquilados de DBT, es la suma de la concentración de células que forman el complejo célula-sustrato y las células libres, en el cual sugieren que se trata de un sistema competitivo por el sustrato.

Sin embargo, para este ensayo, se ha realizado la comprobación gráfica del tipo de cinética microbiana utilizando la representación de Lineweaver-Burk, anteriormente descrita en el apartado 4.2.1.

La figura 4.13 muestra el modelo de Lineweaver-Burk correspondiente para uno de los ensayos en los que se realizó la mezcla de los compuestos Cx-DBT, observándose como todos ellos tienen la misma ordenada en el origen, por lo que se puede llegar a la conclusión de que se trata de un sistema no competitivo por sustrato.



**Figura 4.13. Modelo de Lineweaver-Burk para uno de los ensayos RAE-M utilizado para determinar el tipo de cinética microbiana.**

Este comportamiento puede explicarse, ya que el número de células libres va a ser muy superior a las que van a necesitar para formar los complejos célula-sustrato, debido a la alta concentración de biomasa utilizada y a la baja concentración de sustrato con la que es posible trabajar en condiciones acuosas.

Por otra parte se obtuvieron los correspondientes rendimientos de conversión, los cuales están recogidos en la tabla 4.15. El compuesto que alcanza una mayor conversión, es el DBT como cabría de esperar, alcanzándose la conversión total para un tiempo de reacción de 150 minutos. El compuesto 4MDBT, posee un valor de  $X_{BDS}$  cercano a la conversión total, siendo de 95.70% y el compuesto 4,6DMDBT alcanza un rendimiento de conversión ligeramente menor, obteniéndose un 82.02 %. Finalmente, a 300 minutos de reacción se produce la conversión total de todos los compuestos, excepto de 4,6DEDBT.

La evolución de la concentración de 4,6DEDBT es muy diferente al resto de compuestos Cx-DBT ensayados, manteniéndose casi constante su concentración a lo largo de todo el ensayo. Asimismo, el rendimiento de conversión apenas es del 6.36% para un tiempo de reacción de 150 minutos, muy por debajo de los valores alcanzados para el resto de compuestos presentes en el medio de reacción a ese mismo tiempo, el cual apenas varía hasta el final de la reacción.

#### ***4.3.2.2. Resultados obtenidos en agitador orbital en fase orgánica para Cx-DBT***

##### **Proceso de biodesulfuración de Cx-DBT como único sustrato en fase orgánica**

El estudio cinético de la degradación de los compuestos Cx-DBT utilizando *P. putida* CECT5279 como biocatalizador, en *resting cell* en condiciones bifásicas, se ha llevado a cabo con la determinación de las correspondientes constantes cinéticas aparentes de Cx-DBT, debido a que no se ha podido describir como una cinética tipo Michaelis-Menten, por los mismos problemas descritos anteriormente para DBT. Por lo tanto, para obtener las  $K_{Cx-DBT}$  se ha procedido del mismo modo que para DBT en el apartado 4.3.1.2.

De la misma forma que en los ensayos acuosos, no se ha podido cuantificar los intermedios de la ruta 4S en cada compuesto Cx-DBT, siguiéndose únicamente la degradación del compuesto alquilado en fase orgánica.

Los valores obtenidos para  $K_{Cx-DBT}$  y las correspondientes velocidades iniciales de degradación se recogen en la tabla 4.16.

	RAE-M		
	$Y_{BDS}$ (%) (t= 300 min)	$v_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ ) $\cdot 10^2$	$K(\text{min}^{-1}) \cdot 10^4$
<b>DBT</b>	41.51	2.10	2.65
<b>4MDBT</b>	37.62	2.35	2.07
<b>4,6DMDBT</b>	15.96	0.94	1.24
<b>4,6DEDBT</b>	11.53	0.57	0.51

**Tabla 4.16. Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ , velocidades iniciales,  $v_0$  y constantes cinéticas aparentes,  $K_{Cx-DBT}$  obtenidos para los ensayos RBE-1, RBE-2, RBE-3 y RBE-4.**

Los valores de  $K_{Cx-DBT}$  van a disminuir conforme aumenta el grado de alquilación de los sustituyentes presentes en el anillo aromático, por lo que los mayores valores le corresponden a DBT y 4MDBT, obteniéndose valores de  $2.65 \cdot 10^{-4}$  y de  $2.07 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  respectivamente. Mientras que para 4,6DMDBT y 4,6DEDBT, los valores de  $K_{Cx-DBT}$  obtenidos son inferiores a aquellos compuestos que presentan menor grado de alquilación, obteniéndose valores de  $1.24 \cdot 10^{-4}$  y de  $5.10 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  respectivamente.

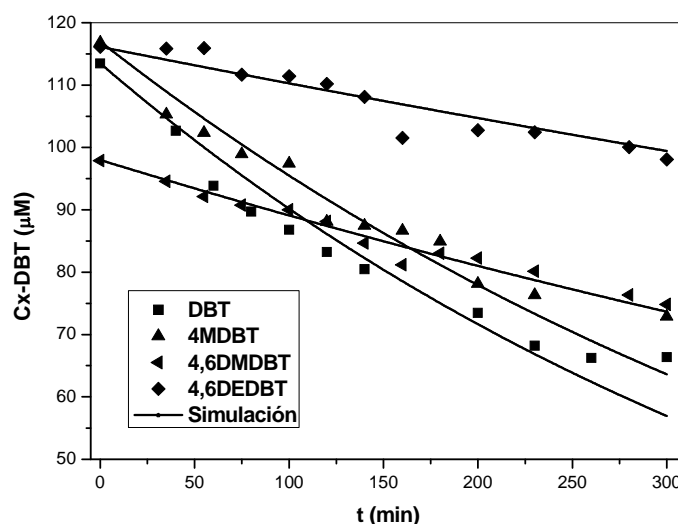
De la misma manera se han obtenido las correspondientes velocidades iniciales de degradación de los compuestos Cx-DBT observándose la misma tendencia. De modo, que las velocidades correspondientes para DBT y 4MDBT, son muy similares, obteniéndose valores de  $2.10 \cdot 10^{-2}$  y  $2.35 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{biomasa}}$  respectivamente.

También se observa como al aumentar el grado de alquilación de los sustituyentes, se produce una disminución de la velocidad de degradación del compuesto Cx-DBT, por lo que las velocidades correspondientes para 4,6DMDBT y 4,6DEDBT son inferiores a las de DBT y 4MDBT, siendo de  $9.40 \cdot 10^{-3}$  y  $5.70 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ .

Por otro lado, se han obtenido los rendimientos de conversión ( $Y_{BDS}$ ) para los compuestos Cx-DBT. La mayor conversión se obtiene para DBT y 4MDBT, obteniéndose un valor de 35.25 % y de 37.62 % respectivamente, para un tiempo total de reacción de 200 minutos. En cambio, para los compuestos 4,6DMDBT y 4,6DEDBT, el rendimiento de conversión, disminuye de forma notable, obteniéndose valores de 23.53 % y 15.55 % respectivamente, para el mismo tiempo de reacción ensayado.

La evolución y la predicción del modelo teórico de los resultados experimentales correspondientes a los ensayos RBE-1, RBE-2, RBE-3 y RBE-4, en los cuales se han utilizado los compuestos DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT respectivamente de manera individual, se muestra en la figura 4.14.





**Figura 4.14.** Evolución y simulación de los valores experimentales correspondientes a Cx-DBT en los ensayos RBE-1, RBE-2, RBE-3 y RBE-4.

Por tanto, los rendimientos de conversión y la velocidad de degradación inicial de los diferentes compuestos alquilados Cx-DBT, van a disminuir conforme aumentaba el grado de alquilación y el tamaño del sustituyente alquilado, ya que se produce un aumento de la hidrofobicidad del compuesto y dificultando el transporte, desde la fase orgánica hacia el interior celular.

Es bien sabido que el proceso de biodesulfuración es una conversión enzimática la cual tiene lugar en el interior celular, (Oda y Ohta, 1994; Monticello, 2000; Abbad-Andaloussi y col., 2003), en la cual únicamente reaccionan aquellas moléculas que pasan a la fase acuosa por gradiente de concentración, traspasando de ese modo, la membrana celular.

En sistemas bifásicos, el microorganismo se va a encontrar en la fase acuosa, y el compuesto susceptible de ser desulfurado, Cx-DBT, se encontrará disuelto en la fase orgánica, por lo tanto para que este sea desulfurado debe pasar de la fase orgánica a la fase acuosa y así entrar en contacto con el microorganismo. Sin embargo, debido a su alta hidrofobicidad, se producen problemas de transferencia de materia (Schmid y col., 1998; Borole, 2002; Marcelis, 2003; Jia y col., 2006), los cuales no se producen en sistemas acuosos. Por lo tanto, el paso limitante será la transferencia de los compuestos

Cx-DBT desde la fase orgánica a la fase acuosa en sistemas bifásicos, la cual quedará dificultada por su elevada hidrofobicidad (Marcelis y col., 2003; Caro y col., 2007).

Por otro lado, los efectos estéricos también afectan al reconocimiento del sustrato por parte del biocatalizador en el proceso de biodesulfuración. Osaka y col., 2001, llegaron a la conclusión que el grado de conversión podía estar afectado, aunque en menor medida, por el efecto de la posición de los sustituyentes en el anillo aromático. La posición de los sustituyentes respecto de enlace C-S, pueden provocar diferencias en la selectividad de los sistemas enzimáticos de los microorganismos. Algunos autores, responsabilizan la disminución de la selectividad a la presencia de los sustituyentes alquilados (metilos y etilos) en la posición 4 del anillo aromático, el cual puede ejercer una distorsión en el reconocimiento específico del biocatalizador sobre el enlace C-S, disminuyendo así su conversión (Kropp y col., 1997; Lu y col., 1999; Onaka y col., 2001).

Se han encontrado numerosos trabajos en bibliografía, los cuales abordan la reacción de biodesulfuración de compuestos Cx-DBT en condiciones bifásicas, utilizando como sustratos compuestos Cx-DBT de forma individual, y en las cuales se han utilizado distintos biocatalizadores. Así, las cepas más utilizadas fueron *Arthrobacter* sp. (Lee y col., 1995), *Sphingomonas paucimobilis* sp (Lu y col., 1999), *Rhodococcus erythropolis* sp. (Folsom y col., 1999; Onaka y col., 2000 y 2001), *Mycobacterium* sp. (Watanabe y col., 2003; Chen y col., 2008), los cuales muestran los resultados obtenidos como rendimientos de desaparición del compuesto Cx-DBT o bien como rendimiento de desaparición de azufre total en el medio.

Por otro lado, Luo y col., 2003, describieron la cinética del proceso de desulfuración de DBT y 4,6DMDBT en presencia de *Pseudomonas delafieldii* R-8, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. En estos ensayos observaron como la velocidad de degradación específica máxima de los compuestos Cx-DBT, disminuía conforme aumentaba el grado de alquilación.

**Proceso de biodesulfuración de mezclas de Cx-DBT en fase orgánica**

Una vez determinadas las constantes cinéticas para los distintos compuestos Cx-DBT de forma individual, se realizó el estudio cinético de mezclas que contenían compuestos de DBT y Cx-DBT con distinto grado de alquilación.

En primer lugar se realizaron ensayos en el cual se adicionaba DBT y un compuesto Cx-DBT, el cual variaba, siendo 4MDBT o 4,6DMDBT según el ensayo. Los resultados de las constantes cinéticas correspondientes a cada Cx-DBT y  $Y_{BDS}$  en cada uno de los ensayos realizados, se muestran en la tabla 4.17.

		$Y_{BDS} (\%) (t=300 \text{ min})$	$v_0$ $(\mu\text{mol}/\text{min g}_{\text{biomasa}}) \cdot 10^2$	$K(\text{min}^{-1}) 10^4$
<b>RBE-M-1</b>	<b>DBT</b>	36.53	2.23	1.25
	<b>4MDBT</b>	28.79	1.7	0.71
<b>RBE-M-2</b>	<b>DBT</b>	33.94	2.02	1.38
	<b>4,6DMDBT</b>	21.01	1.57	0.14

**Tabla 4.17. Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ , velocidades iniciales de degradación y coeficiente de transferencia de materia,  $K$ , obtenidos para los ensayos RBE-M-1 y RBE-M-2.**

En el ensayo RBE-M-1 se observó que el valor de la velocidad inicial de degradación de DBT es ligeramente superior que para el compuesto 4MDBT. Del mismo modo sucede con el valor de la constante cinética de los Cx-DBT, el cual es superior para DBT, que toma un valor de  $1.25 \cdot 10^{-4}$  frente a  $7.10 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  para 4MDBT. Si se comparan estos valores con los calculados en los ensayos en los que se utilizaban como sustratos únicos, recogidos en la tabla 4.16, puede observarse como las constantes cinéticas de cada compuesto Cx-DBT, disminuyen en la mezcla.

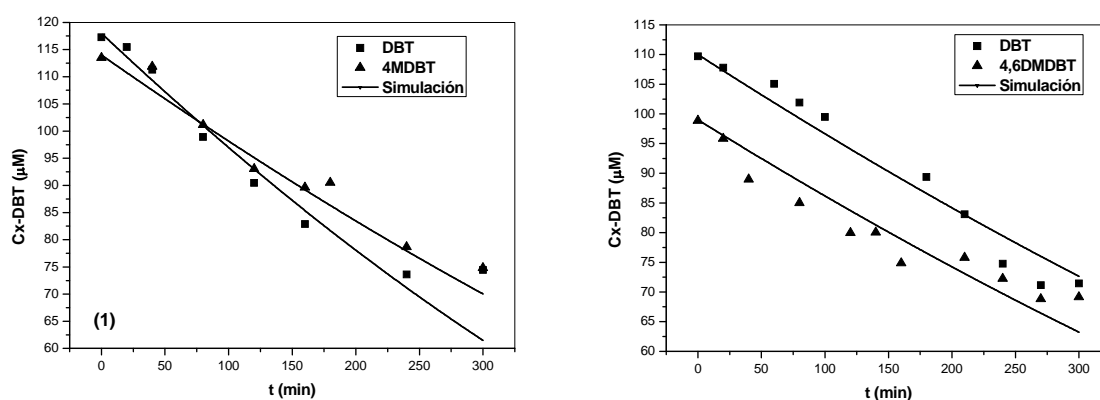
Esta misma tendencia fue observada al obtener los rendimientos de conversión,  $Y_{BDS}$ , para DBT y 4MDBT, los cuales fueron de 36.53 y 28.79 % respectivamente, siendo inferiores a los obtenidos en los ensayos individuales y en el cual se obtuvo la mayor conversión para el compuesto con menor alquilación.

El mismo comportamiento que en el ensayo anterior, se ha observado en el ensayo RBE-M-2, en el cual la mezcla de reacción estaba compuesta por DBT y 4,6DMDT.

De forma que se obtuvieron velocidades iniciales inferiores a las correspondientes en los ensayos individuales, obteniéndose valores de  $2.02 \cdot 10^{-2}$  y  $1.57 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$  respectivamente para DBT y para 4,6DMDT.

De la misma forma, los valores de las constantes cinéticas de Cx-DBT, para DBT y 4,6DMDT obtenidos en ese ensayo, son inferiores a los correspondientes ensayos en los que se utilizó cada uno de ellos de forma individual. Asimismo, los rendimientos de conversión obtenidos para cada uno de ellos, fueron de 20.90 y 17.76 % para DBT y 4,6DMDT respectivamente.

La evolución de los datos experimentales para los ensayos RBE-M-1 y RBE-M-2, para los compuestos DBT, 4MDBT y 4,6DMDT, se muestran en la figura 4.15.



**Figura 4.15.** Evolución y simulación de la degradación de Cx-DBT en los ensayos (1) RBE-M-1, y (2) RBE-M-2.

En la literatura, se han encontrado numerosos trabajos en los cuales se han utilizado como medio de reacción mezclas de DBT y 4,6DMDT, en condiciones de *resting cell* en medio bifásico. Lu y col., 1999, utilizaron como biocatalizador *Sphingomonas paucimobilis* TZS-7, utilizando como medio orgánico *n*-octano. En estos ensayos observaron como la degradación de 4,6DMDT se observaba únicamente cuando la totalidad de DBT había sido degradada previamente. Esto indicaría que la

degradación de 4,6DMDBT esta severamente inhibida por la presencia de DBT, ya que el mecanismo enzimático de degradación de ambos es el mismo, imponiéndose un mecanismo enzimático por inhibición por presencia de sustrato.

Otros autores, llegaron a la misma conclusión. Luo y col., 2003, realizaron ensayos con mezclas de 10mM de DBT y 4,6DMDBT en condiciones bifásicas, utilizando como fase acuosa 50 g/L *Pseudomonas delafieldii* R-8, en presencia de dodecano como fase orgánica, con una ratio de fases 1:1. En este ensayo obtienen una mayor conversión para DBT frente a la de 4,6DMDBT, siendo de 97 y 86 % respectivamente, para un tiempo de reacción de 18 horas y cuyas velocidades específicas de desulfuración también eran mayores para DBT, siendo de 11.4 frente a 9.4 mmol de azufre Kg<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, para 4,6DMDBT.

Por otro lado, Chen y col., 2008, realizaron distintos ensayos utilizando 0.5 mM de DBT y 4,6DMDBT, solos y mezclados, utilizando 15 g/L de *Mycobacterium* sp. ZD-19 como biocatalizador en medio bifásico formado por hexadecano en una proporción 2:1. Los rendimientos de conversión alcanzados para DBT y 4,6DMDBT por separado fueron de 100 y 57.3% y en la mezcla de ambos compuestos se obtuvieron rendimientos de conversión de 91.6 y 53.2% respectivamente. En el caso de las velocidades específicas de desulfuración también observaron como disminuían en la mezcla, obteniéndose valores de 2.984 y 1.756 mM Kg<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para DBT y 4,6DMDBT por separado, disminuyendo en la mezcla obteniendo 1.780 y 0.624 mM Kg<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para cada uno respectivamente. Estos autores llegaron a la conclusión que el DBT era atacado preferentemente antes que 4,6DMDBT, de forma que los rendimientos de desulfuración obtenidos para DBT en la mezcla y de forma individual eran prácticamente iguales. El compuesto 4,6DMDBT era atacado cuando la mayoría de DBT había sido desulfurado, lo cual indica que existía una inhibición por competencia de sustrato.

Para comprobar el efecto conjunto, sobre el proceso de biodesulfuración, de una mezcla compuesta por un mayor número de Cx-DBT, se realizó el ensayo RBE-M-3. En este ensayo, se utilizó como medio de reacción una mezcla de formada por compuestos Cx-DBT: DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT.

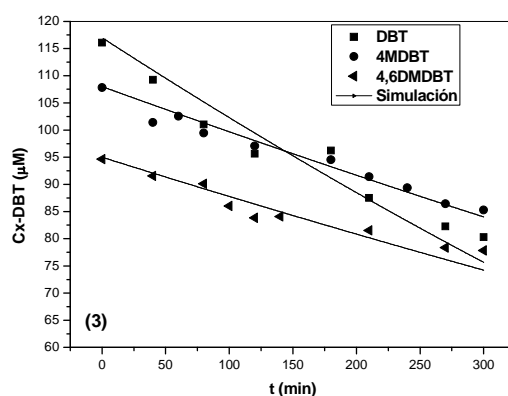
Los resultados recogidos en la tabla 4.18, muestran como los valores de las constantes cinéticas y de la velocidad específica inicial para cada Cx-DBT, los cuales disminuyen de forma acusada respecto de los valores obtenidos en los ensayos individuales para cada uno de los compuestos utilizados.

El mayor valor de  $K_{Cx-DBT}$  obtenido fue para DBT, donde se obtuvo un valor de  $1.45 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . En el caso de 4MDBT y 4,6DMDBT se obtuvieron valores muy similares de  $K_{Cx-DBT}$ , siendo de  $8.30 \cdot 10^{-4}$  y  $8.20 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

		$Y_{BDS} (\%) (t=300 \text{ min})$	$v_0$ $(\mu\text{mol}/g_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}) \cdot 10^2$	$K(\text{min}^{-1}) \cdot 10^4$
<b>RBE-M-3</b>	<b>DBT</b>	30.85	1.95	1.45
	<b>4MDBT</b>	20.9	0.89	0.83
	<b>4,6DMDBT</b>	17.76	0.76	0.82

**Tabla 4.18.** Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ , velocidades iniciales de degradación y coeficiente de transferencia de materia,  $K$ , obtenidos para los ensayos RBE-M-1 y RBE-M-2.

Los valores experimentales correspondientes al ensayo RBE-M-3 se muestran en la figura 4.16, en la cual puede apreciarse una mayor conversión de DBT que de 4MDBT y 4,6DMDBT.



**Figura 4.16.** Evolución y predicción del modelo teórico de la degradación de Cx-DBT en el ensayo RBE-M-3.

Por otro lado, el rendimiento de conversión también va a disminuir de forma importante para los compuestos en la mezcla respecto de los ensayos individuales. De forma que para DBT y 4,6DMDBT se obtienen valores de  $Y_{BDS}$  de 30.85% y 17.76%,

disminuyendo la conversión en un 25 % respecto del ensayo individual. En el caso de 4MDBT la conversión se ve mucho más afectada en la mezcla, obteniéndose un rendimiento de conversión de 20.90%, disminuyendo la conversión en un 55% respecto de los ensayos realizados individualmente. Asimismo, los valores obtenidos de  $v_0$  y  $Y_{BDS}$  en este ensayo son inferiores incluso a los obtenidos en los ensayos en los que se ha utilizado una mezcla de dos compuestos Cx-DBT.

Por tanto, un aumento de la hidrofobicidad de los compuestos Cx-DBT producido por la presencia de un mayor número y tamaño de sustituyentes, provoca una disminución del rendimiento de conversión y de las velocidades específicas iniciales de degradación, puesto que dificulta la puesta en contacto del microorganismo con el compuesto Cx-DBT, lo cual se corrobora por otro lado, con los valores de  $K_{Cx-DBT}$  obtenidos para cada compuesto, ya que el paso limitante es la transferencia de Cx-DBT desde la fase orgánica hasta el interior celular, que se ve desfavorecida al aumentar su hidrofobicidad. Además, como se ha comentado anteriormente, la presencia de sustituyentes en la posición 4 del anillo aromático de los compuestos Cx-DBT, dificulta que el biocatalizador reconozca de manera selectiva el enlace C-S.

Algunos autores han obtenido comportamientos similares en la degradación de Cx-DBT de diferente grado de alquilación utilizando biocatalizadores de distinta naturaleza. Los experimentos realizados por Watanabe y col., 2003, en los cuales utilizaron como biocatalizador el microorganismo *Mycobacterium sp.* Strain MR65, en un sistema bifásico formado por compuestos de distinta alquilación: DBT, 4,6DEDBT, 4,6DPDBT, 4,6BTDBT y 2,4,6,8TDBT, en una concentración de 1.4 mM disueltos en *n*-hexadecano. En este ensayo observaron como la velocidad específica de desulfuración y el rendimiento de conversión disminuía al aumentar la alquilación de los sustituyentes, y con ello su hidrofobicidad.

Asimismo, Noda y col., 2003, realizaron experimentos en *resting cell* en un sistema bifásico a escala de Erlenmeyer, en el cual la fase orgánica estaba constituida por una mezcla de DBT, 4,6DMDBT, 4,6DEDBT y 4,6DPDBT disuelto previamente en tetradecano, con una concentración total de azufre de 126 ppm. La fase acuosa estaba constituida por 11.7 g/L de la cepa *Mycobacterium sp.* NCIMB 10403, y por tampón

fosfato de potasio en la misma proporción, con unas condiciones de operación de 30°C, 130 rpm y 24 horas de reacción.

Por otro lado, Onaka y col., 2001, realizaron el estudio de la desulfuración de una mezcla de distintos compuestos Cx-DBT con distinto grado de alquilación, variable entre C<sub>0</sub> y C<sub>3</sub>. No solo estudiaron el efecto del grado de alquilación, sino también el efecto del tamaño de los sustituyentes, utilizando distintos tipos: metilo, etilo y propilo. La reacción se desarrolló en un sistema bifásico, utilizando como fase orgánica *n*-tetradecano, la cual contenía una concentración total de azufre de 100 ppm. La fase acuosa estaba compuesta por 0.1 mM de tampón fosfato y 12 g/L de *Rhodococcus erythropolis* sp. KA2-5-1. Los ensayos los realizaron en frascos Sakaguchi de 500 mL de capacidad y unas condiciones de operación de 30°C de temperatura, 130 rpm de agitación y 24 horas de reacción.

Todos estos autores observaron como al aumentar el número y tamaño de los sustituyentes presentes en el anillo aromático de los compuestos Cx-DBT producía una disminución del rendimiento de desulfuración, en el cual el paso limitante era la transferencia de Cx-DBT desde la fase orgánica al interior celular, que se veía desfavorecida al aumentar su hidrofobicidad.

Por otra parte, llegan a la conclusión de que la presencia de sustituyentes en las posiciones 4 y 6 del anillo aromático desfavorecen el reconocimiento del enlace C-S para aquellos compuestos Cx-DBT que los posean, disminuyendo la especificidad de desulfuración por el sistema enzimático.

#### ***4.3.2.3. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase acuosa para Cx-DBT***

##### **Proceso de biodesulfuración de Cx-DBT como único sustrato**

La tabla 4.19 recoge los valores obtenidos de  $v_{max}$ ,  $k_m$  y  $Y_{BDS}$  para los ensayos realizados a escala de tanque agitado, correspondiente a los ensayos RAT-1, RAT-2 y RAT-3, para los cuales se han utilizado como sustratos DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT.



	X	RAT-X		
		Y <sub>BDS</sub> (%) (t=200 min)	v <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>
DBT	1	100	0.950	1.060
4MDBT	2	100	0.225	1.060
4,6DMDBT	3	100	0.269	1.060

*v<sub>max</sub> : μmol/ min g<sub>biomasa</sub>; K<sub>m</sub>: μM..*

**Tabla 4.19. Valores de los rendimientos de conversión Y<sub>BDS</sub>, v<sub>max</sub> y K<sub>m</sub>, obtenidos para los ensayos RAT-1, RAT-2 y RAT-3.**

Como puede observarse, los valores de v<sub>max</sub> para DBT son muy superiores al resto de Cx-DBT ensayados, obteniéndose un valor de 0.950 μmol/g<sub>biomasa</sub>·min. Este comportamiento es el mismo que se ha dado en los ensayos realizados en agitador orbital, donde el compuesto que posee menor grado de alquilación se degrada más rápidamente que aquellos que poseen uno o dos sustituyentes en el anillo aromático. Por otro lado, se obtiene la conversión total para todos los compuestos Cx-DBT a los 200 minutos de reacción.

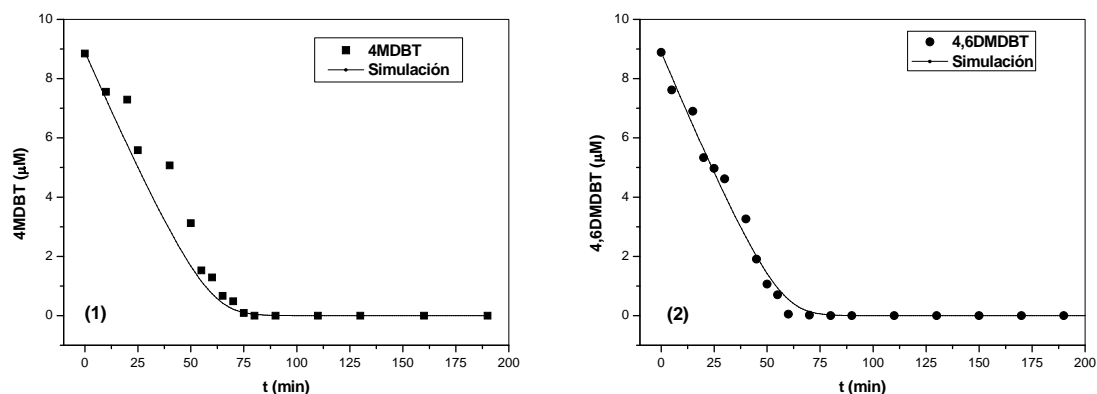
En cambio, los valores de la velocidad de degradación correspondientes a 4MDBT y 4,6DMDBT, son muy similares, siendo ligeramente superior para 4,6DMDBT. Los valores de K<sub>m</sub> son iguales para ambos sustratos, lo que quiere decir, que el biocatalizador va a tener la misma afinidad por cualquiera de ellos.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los ensayos acuosos realizados con distintas concentraciones de sustrato, se observa que en todos los casos, los valores correspondientes a las velocidades específicas y a los rendimientos de conversión alcanzados en los ensayos realizados en tanque agitado, son muy superiores a los obtenidos en agitador orbital, lo que demuestra que el efecto de la concentración de biomasa no es determinante en la velocidad de reacción, en los intervalos de concentración ensayados. El aporte constante de oxígeno al microorganismo durante toda la reacción, así como un sistema de agitación distinto al del agitador orbital, mejoran la transferencia del sustrato al interior celular, obteniéndose mayores rendimientos de conversión a velocidades más elevadas.

La mayoría de trabajos encontrados en bibliografía en condiciones de *resting cell* en sistemas acuosos se han realizado a escala de agitador orbital. En cambio, no se ha

encontrado ningún trabajo en el que se haya utilizado escala de tanque agitado en estas condiciones. Los trabajos existentes en los que se ha utilizado escala de tanque agitado se centran en el uso de sistemas bifásicos, los cuales se estudian en el apartado 4.3.2.4.

La simulación de los resultados correspondientes a los ensayos RAT-2 y RAT-3, se muestran en la figura 4.17.



**Figura 4.17. Simulación de la degradación de Cx-DBT en los ensayos RAT-2 (1) y RAT-3 (2) en tanque agitado en fase acuosa.**

### **Proceso de biodesulfuración de mezclas de Cx-DBT**

Como en los apartados anteriores, también se han realizados ensayos en los cuales se han utilizado como sustrato una mezcla de compuestos Cx-DBT, utilizando distintas mezclas de DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT.

Para realizar el estudio cinético de los ensayos RAT-M-1, RAT-M-2 y RAT-M-3 se ha utilizado una ecuación tipo Michaelis-Menten, como en el caso de los ensayos donde se utilizaba como sustrato Cx-DBT de forma individual. En los ensayos RAT-M-1 y RAT-M-2, el sustrato estaba compuesto por una mezcla de DBT con 4MDBT y 4,6DMDBT respectivamente. En ambos casos puede observarse como la velocidad específica de conversión de DBT es mucho mayor que las correspondientes a cada Cx-DBT en la mezcla, degradándose a mayor velocidad, pero sin embargo se obtiene un rendimiento de conversión total para ambos compuestos al final de la reacción. Los valores de  $v_{max}$ ,  $k_m$  y  $Y_{BDS}$  para los ensayos RAT-M-1 y RAT-M-2 se recogen en la tabla 4.20.

		$Y_{BDS}$ (%) (t=200 min)	$v_{max}$	$K_m$
RAT-M-1	DBT	100	0.650	1.060
	4MDBT	100	0.195	1.060
RAT-M-2	DBT	100	0.850	1.060
	4,6DMDBT	100	0.219	1.060

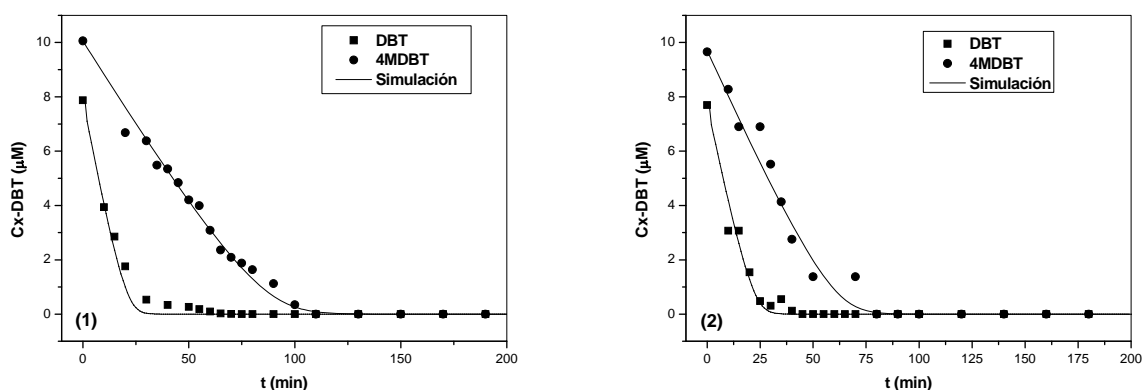
$v_{max}$  :  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ ;  $K_m$ :  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 4.20.** Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ ,  $v_{max}$  y  $K_m$  obtenidos para los ensayos RAT-M-1, RAT-M-2 y RAT-M-3.

En el ensayo RAT-M-1, se obtienen valores de  $v_{max}$  inferiores para DBT y 4MDBT con respecto a los valores obtenidos en el ensayo individual. Por otro lado, el valor de  $k_m$  se mantiene constante para DBT y 4MDBT, teniendo incluso el mismo valor que en los ensayos individuales, lo que indica que el modelo cinético se ajusta a una inhibición de sustrato no competitivo, como sucedía en agitador orbital.

En el ensayo RAT-M-2 ocurre algo muy similar, de forma que los valores de las velocidades específicas son inferiores, tanto para DBT como para 4,6DMDBT, respecto a los valores correspondientes a los ensayos individuales, manteniendo el mismo valor de  $k_m$ , por lo que puede considerarse que se ajustará a cinética de inhibición de sustrato no competitiva.

La figura 4.18 muestra la evolución y simulación de los resultados obtenidos para los ensayos RAT-M-1, RAT-M-2 y RAT-M-3.



**Figura 4.18.** Evolución y simulación de la degradación de Cx-DBT en los ensayos RAT-M-1 (1) y RAT-M-2 (2).

Por otro lado, en el ensayo RAT-M-3 se ha utilizado como sustrato una mezcla de compuestos Cx-DBT con distinto grado de alquilación, formada por DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT. La tabla 4.21 recoge los valores correspondientes a  $v_{max}$ ,  $K_m$  y  $Y_{BDS}$ . Las velocidades específicas máximas de degradación obtenidas DBT y 4MDBT han sido ligeramente inferiores a las obtenidas en los ensayos individuales. Sin embargo, el compuesto 4,6DMDBT posee una velocidad específica muy inferior respecto del ensayo individual e incluso del ensayo en el cual se usaba una mezcla binaria de compuestos Cx-DBT.

		$Y_{BDS}$ (%) (t=200 min)	$v_{max}$	$K_m$
RAT-M-3	DBT	100	0.85	1.06
	4MDBT	88.06	0.115	1.06
	4,6DMDBT	46.82	0.085	1.06

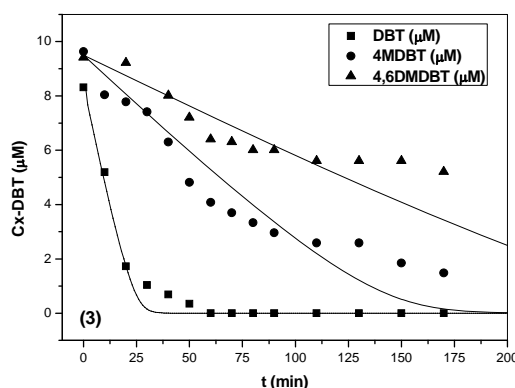
$v_{max}$  :  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min}$ ;  $K_m$ :  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 4.21.** Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ ,  $v_{max}$  y  $K_m$  obtenidos para el ensayo RAT-M-3.

Por otra parte, solo se obtiene un rendimiento de conversión total para DBT, pero para los compuestos 4MDBT y 4,6DMDBT fueron de 88.06 y 46.82 %, los cuales son inferiores a los resultados obtenidos en los ensayos individuales y en aquellos en los que se utilizaba una mezcla de estos compuestos con DBT. Los valores de  $k_m$  vuelven a ser los mismos para los tres compuestos entre sí y respecto de los ensayos individuales y en las mezclas anteriores, de modo que de la misma manera puede decirse que la cinética se ajusta a una inhibición de sustrato no competitiva, como en el caso de los ensayos de mezclas realizados a escala de agitador orbital.

Si se comparan los valores obtenidos de  $v_{max}$ ,  $k_m$  y  $Y_{BDS}$ , con los obtenidos a escala de agitador orbital, se puede deducir que la reacción de biodesulfuración a escala de tanque agitado esta mucho más favorecida, obteniéndose valores de  $v_{max}$  y  $Y_{BDS}$  muy superiores para todos los compuestos Cx-DBT, tanto en el caso de los ensayos individuales como en las mezclas. Este hecho puede justificarse del mismo modo que para el caso de DBT descrito anteriormente, produciéndose un aporte constante de oxígeno a lo largo de toda la reacción, y una mejora en la transferencia del sustrato por el uso de palas como mecanismo de agitación.

En la figura 4.19 se muestra la evolución de los datos experimentales y la estimación del modelo cinético utilizado, en el ensayo RAT-M-3.



**Figura 4.19.** Simulación de la degradación de Cx-DBT en el ensayo RAT-M-3.

#### 4.3.2.4. Resultados obtenidos en tanque agitado en fase orgánica para Cx-DBT.

##### Proceso de biodesulfuración de Cx-DBT como único sustrato

En este apartado se han utilizado como sustratos los mismos compuestos Cx-DBT con distinto grado de alquilación, empleados anteriormente a escala de agitador orbital.

Los resultados obtenidos en los ensayos con DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT y 4,6DEDBT, correspondiente a los ensayos RBT-1, RBT-2, RBT-3 y RBT-4, se muestran en la tabla 4.22.

	RBT-X			
	X	$Y_{BDS}$ (%) (t=24H)	$v_0$ ( $\mu\text{mol}/g_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ ) $\cdot 10^3$	$K(\text{min}^{-1}) \cdot 10^4$
<b>DBT</b>	1	38.80	11.7	2.67
<b>4MDBT</b>	2	19.50	5.04	1.56
<b>4,6DMDBT</b>	3	16.51	5.38	2.16
<b>4,6DEDBT</b>	4	8.77	0.51	0.35

**Tabla 4.22.** Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ ,  $v_0$  y  $K_{Cx-DBT}$  obtenidos para los ensayos RBT-1, RBT-2, RBT-3 y RBT-4.

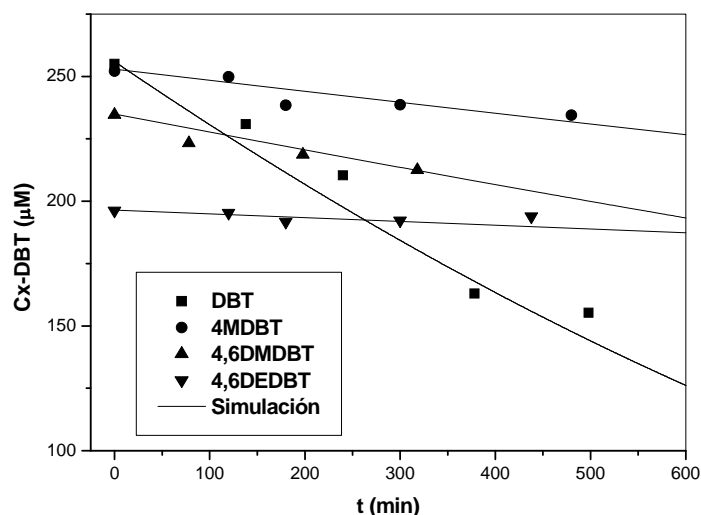
Como puede observarse en la tabla 4.20, los valores de las velocidades iniciales van a disminuir conforme aumenta el número y el tamaño de los sustituyentes en el

anillo aromático, obteniéndose un valor máximo de  $1.14 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/ g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$  para el compuesto DBT, y un valor mínimo para 4,6DEDBT, siendo el compuesto más lentamente degradado, con una velocidad específica inicial de degradación de  $5.31 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ .

Por otro lado, atendiendo a los valores de  $K_{\text{Cx-DBT}}$  se observa como disminuyen conforme aumenta el grado de alquilación de los compuestos Cx-DBT. De modo que el valor de  $K_{\text{Cx-DBT}}$  se hace máximo para DBT, con un valor de  $2.67 \cdot 10^{-4} \text{min}^{-1}$ , y haciéndose mínimo para el caso de 4,6DEDBT, con un valor de  $3.50 \cdot 10^{-5} \text{min}^{-1}$ .

Siguiendo la misma tendencia, se puede observar como la máxima conversión se alcanza para DBT con un 38.80 %. En cambio, muy por debajo de estos resultados, le seguirían el compuesto 4MDBT y para 4,6DMDBT, con una conversión de 19.50 y 16.51 %, y el compuesto que presenta una menor conversión es 4,6DEDBT con un valor de 8.77% a las 24 horas de reacción.

En la figura 4.20, se muestran la evolución de los resultados experimentales obtenidos a lo largo de la reacción de biodesulfuración en los ensayos RAT-1, RAT-2, RAT-3 y RAT-4, en la cual se observa una caída rápida para DBT, y por tanto una mayor conversión y una mínima conversión para el compuesto 4,6DEDBT.



**Figura 4.20. Evolución y simulación de la degradación de Cx-DBT en los ensayos RBT-1, RBT-2, RBT-3 y RBT-4.**

Como se ha explicado anteriormente, el aumento de la hidrofobicidad de los compuestos Cx-DBT empeora la reacción de desulfuración, dificultando el contacto entre el compuesto Cx-DBT y el microorganismo, disminuyendo así su reactividad. Al igual que en los ensayos acuosos y orgánicos anteriores, el orden de reactividad de los compuestos Cx-DBT es el mismo, de modo el compuesto más reactivo es siempre el que no posee alquilación, DBT, y el menos reactivo, es el que posee mayor número y tamaño de sustituyentes en el anillo aromático, siendo por tanto el de mayor hidrofobicidad, 4,6DEDBT. Asimismo, la reacción de biodesulfuración también está desfavorecida, aunque en menor medida, por los efectos negativos que produce la presencia de sustituyentes en la posición 4 y 6 del anillo aromático, lo cual dificulta el reconocimiento por parte del microorganismo del enlace C-S del anillo.

**Proceso de biodesulfuración de mezclas de Cx-DBT**

Del mismo modo que en los ensayos realizados anteriormente, se ha realizado el estudio cinético basado en la obtención de las correspondientes constantes cinéticas para cada Cx-DBT presentes en la mezcla, así como de la obtención de las velocidades específicas iniciales, para los ensayos RBT-M-1 y RBT-M-2. Por otra parte, se han obtenido los valores de los rendimientos de conversión para cada compuesto Cx-DBT.

Los datos correspondientes a rendimiento de conversión, velocidad inicial de degradación y constantes cinéticas, para el ensayo RBT-M-1 se muestran en la tabla 4.23.

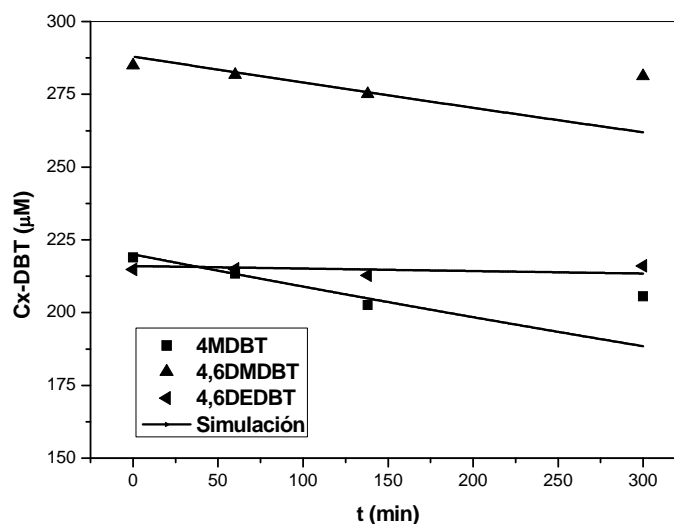
	<b><math>Y_{BDS}</math> (%) (t=24H)</b>	<b><math>v_0</math> (<math>\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}</math>) <math>\cdot 10^3</math></b>	<b><math>K</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>) <math>\cdot 10^4</math></b>
<b>4MDBT</b>	17.87	6.90	5.16
<b>4,6DMDBT</b>	11.28	4.74	3.16
<b>4,6DEDBT</b>	1.89	0.97	0.40

**Tabla 4.23. Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ , velocidad inicial de degradación y constante cinética obtenidos para el ensayo RBT-M-1.**

Como era de esperar, tanto las velocidades específicas iniciales de degradación, como las constantes cinéticas de cada Cx-DBT, van a disminuir conforme aumenta el grado y tamaño de los sustituyentes. Los valores máximos de  $v_0$  y  $K_{Cx-DBT}$ , se obtienen

para 4MDBT, obteniéndose valores de  $6.90 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$  y de  $5.16 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  respectivamente. Los valores mínimos se obtienen para el compuesto 4,6DEDBT, siendo este el compuesto más hidrófobo, y en los que han obtenido valores de  $v_0$  y  $K_{\text{Cx-DBT}}$  de  $9.70 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$  y de  $4.00 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  respectivamente. Por otra parte puede observarse como los rendimientos de degradación disminuyen de la misma forma, de modo que estos van a disminuir conforme aumenta el grado de alquilación. Los valores de  $Y_{\text{BDS}}$  obtenidos para cada compuesto Cx-DBT en la mezcla fueron de 17.87% para 4MDBT, 11.28% para 4,6DMDBT y 1.89% para 4,6DEDBT, en el cual apenas hay conversión.

La simulación de los resultados experimentales correspondientes a cada compuesto Cx-DBT en el ensayo RBT-M-1, se muestran en la figura 4.21.



**Figura 4.21.** Simulación de los datos experimentales de la degradación de Cx-DBT en el ensayo RBT-M-1.

De forma general puede apreciarse que tanto los rendimientos de conversión, como las velocidades específicas iniciales de degradación de cada compuesto Cx-DBT, disminuyen de forma importante respecto de las obtenidas en los ensayos individuales correspondientes, por lo que los problemas de transporte se agravan debido a la elevada hidrofobicidad de todos los compuestos utilizados en la mezcla.

En el caso del ensayo RBT-M-2, los datos correspondientes a  $Y_{\text{BDS}}$ ,  $v_0$  y  $K_{\text{Cx-DBT}}$  se muestran en la tabla 4.24.

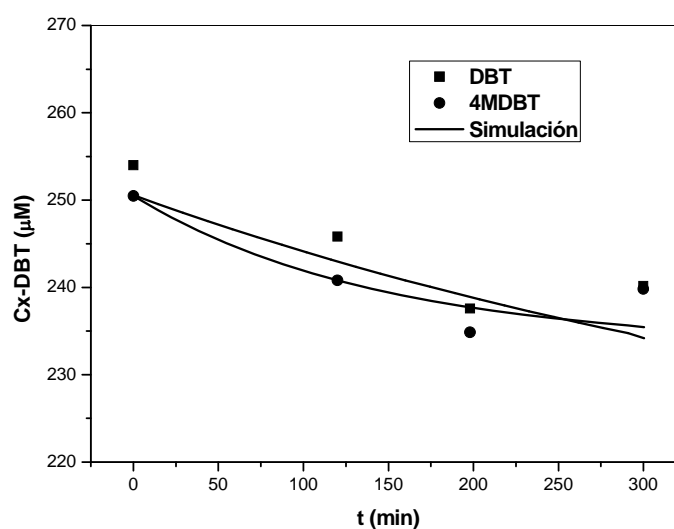


	<b><math>Y_{BDS}</math> (%) (t=24H)</b>	<b><math>v_0</math> (<math>\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min}</math>)<math>\cdot 10^3</math></b>	<b><math>K</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)<math>\cdot 10^4</math></b>
<b>DBT</b>	14.94.	3.18	1.25
<b>4MDBT</b>	6.98	1.76	0.70

**Tabla 4.24.** Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ ,  $v_0$  y  $K_{Cx-DBT}$  obtenido para el ensayo RBT-M-2.

Como puede observarse, la conversión de DBT va a estar más favorecida que la del compuesto 4MDBT. Las velocidades iniciales específicas para DBT son más elevadas que las de 4MDBT, siendo de  $3.18\cdot 10^{-3}$  y de  $1.76\cdot 10^{-3}$   $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min}$  respectivamente. Del mismo modo, la constante cinética es mucho mayor en el caso de DBT, obteniéndose un valor de  $1.25\cdot 10^{-4}\text{min}^{-1}$ , frente a  $7.01\cdot 10^{-5}\text{min}^{-1}$  correspondiente a 4MDBT. Por otra parte, el rendimiento de conversión obtenido para DBT a las 24 horas de reacción, es superior al de 4MDBT, siendo de 14.94 y 6.98 % respectivamente. Si se comparan los valores de las velocidades iniciales, de la constante cinética y del rendimiento de conversión en los ensayos en los que se utilizaba el compuesto Cx-DBT de manera individual, puede observarse como se obtienen valores inferiores en la mezcla, de forma que la presencia de varios compuestos Cx-DBT empeora la conversión de DBT y de 4MDBT, viéndose más afectada la conversión de 4MDBT.

En la figura 4.22 se muestra la evolución de los resultados experimentales correspondientes a DBT y a 4MDBT, en el ensayo RBT-M-2.



**Figura 4.22.** Simulación de los datos experimentales de la degradación de Cx-DBT en el ensayo RBT-M-1.

En la literatura existen pocos trabajos que aborden el estudio cinético del proceso de biodesulfuración en condiciones bifásicas utilizando como escala de operación el biorreactor de tanque agitado. Kobayashi y col., 2001, realizaron el estudio cinético de una mezcla de distintos compuestos Cx-DBT, obteniendo resultados similares a los obtenidos en este trabajo. De forma, que la velocidad específica máxima de degradación del compuesto alquilado era mayor conforme disminuía el grado de alquilación, así como su conversión.

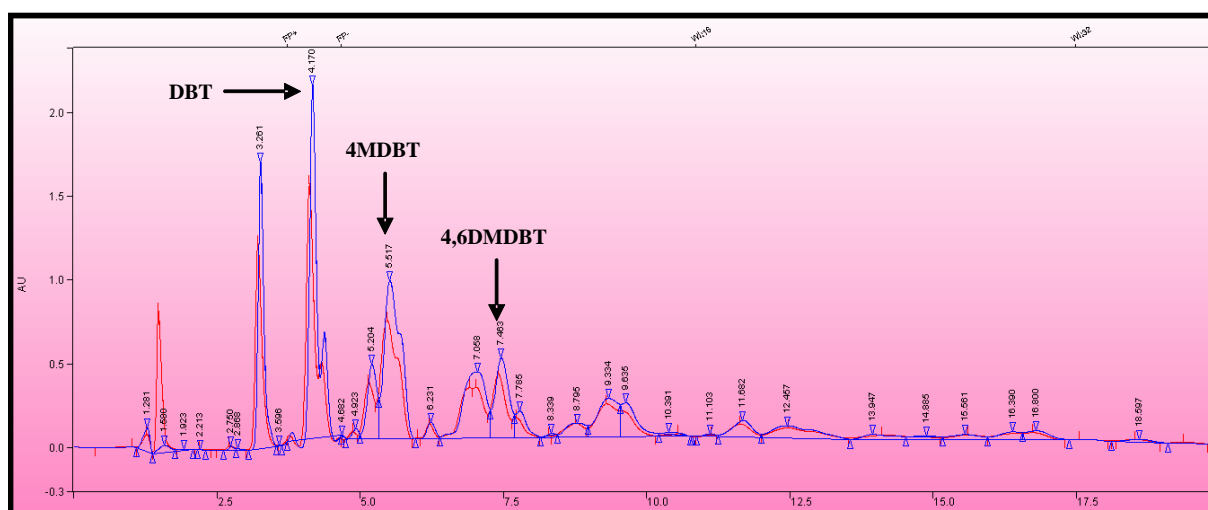
El experimento se realizó en condiciones de *resting cell* en un sistema bifásico en tanque agitado de 2L de capacidad. Para ello utilizaron como fase orgánica una mezcla de 3.12 mM de DBT, 4MDBT, 4,6DMDBT y 3,4,6TMDBT, en *n*-tetradecano, y utilizando 12 g/L de *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 como biocatalizador, en tampón fosfato, en proporción 1:1. Las condiciones de operación fueron de 30°C de temperatura, 600 rpm de agitación y 1 VVM de aireación.

#### 4.4. BIODESULFURACIÓN DE UNA MEZCLA HIDRODESULFURADA

En este apartado se ha llevado a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos más significativos presentes en una muestra real, procedente de la etapa de estabilización del proceso de hidrodesulfuración de la empresa Repsol, la cual posee una concentración de azufre inferior a 50 ppm.

El ensayo se realizó en condiciones de *resting cell* en medio bifásico a escala de tanque agitado, utilizando como fase acuosa 15 g/L de *Pseudomona putida* CECT5279 de 12 horas de crecimiento producida en *air-lift* de 2L. La fase acuosa también estaba formada por Hepes pH=8 y a la que se añadió 1% (v/v) de Tween 85 y 0.5% (v/v) de etanol. La fase orgánica estaba compuesta por el hidrodesulfurado, y la proporción entre fases fue de 1:1. Las condiciones de operación fueron de 250 rpm de agitación, 30°C de temperatura, un caudal de aireación de 1L/L·min y 180 minutos de reacción.

A pesar de la dificultad existente en la identificación de los compuestos presentes en la muestra, por la existencia de una matriz muy compleja, se han podido identificar los compuestos más abundantes, que han sido detectados por HPLC-DAD. Los compuestos más significativos identificados han sido DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT, con una concentración de 124.75, 71.3 y 49.25  $\mu\text{M}$ . La figura 4.23 muestra el cromatograma correspondiente a muestra de hidrodesulfurado antes y después de la reacción de BDS.



**Figura 4.23.** Cromatograma correspondiente a la muestra de hidrodesulfurado utilizada en este trabajo, a tiempo inicial y una vez terminada la reacción de biodesulfuración.

No ha sido posible cuantificar los compuestos intermedios de la ruta 4S producidos durante la reacción de biodesulfuración de los compuestos Cx-DBT, debido a la complejidad de la matriz. Sin embargo, se ha observado la aparición así como el aumento de una serie de picos a lo largo de la reacción, los cuales se cree que están directamente relacionados con la conversión de Cx-DBT y que corresponderían a los compuestos finales Cx-HBP, ya que tienen espectros de absorbanza molecular muy similares a 2HBP.

Para describir el proceso de biodesulfuración de la muestra real e hidrodesulfurado, ha sido necesario realizar el estudio cinético de los compuestos presentes en la mezcla, el cual se ha basado en la obtención de las correspondientes velocidades iniciales de degradación y de las constantes cinéticas aparentes de cada compuesto Cx-DBT.

Por otra parte, y del mismo modo que en los ensayos anteriores se han obtenido los correspondientes rendimientos de conversión. Todos estos resultados se muestran en la tabla 4.25.

	<b><math>Y_{BDS}</math> (%) (t=180 min)</b>	<b><math>v_0</math> (<math>\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}</math>) <math>\cdot 10^2</math></b>	<b><math>K(\text{min}^{-1}) \cdot 10^4</math></b>
<b>DBT</b>	29.22	9.10	9.08
<b>4MDBT</b>	20.47	1.12	2.28
<b>4,6DMDBT</b>	27.31	1.57	1.20

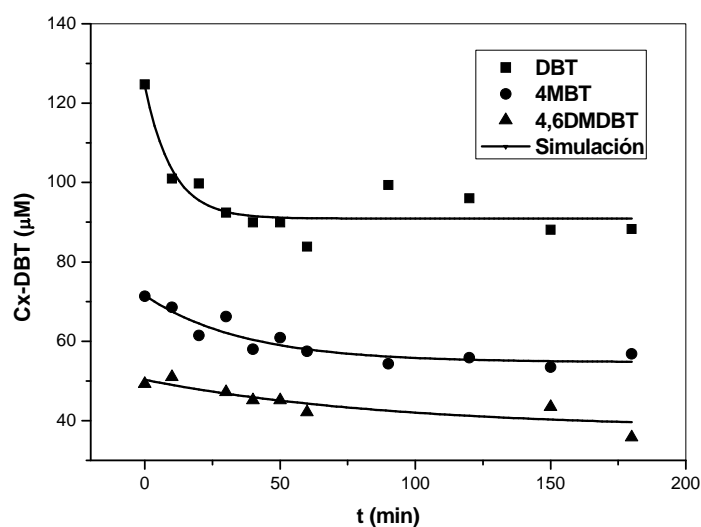
**Tabla 4.25. Valores de los rendimientos de conversión  $Y_{BDS}$ ,  $v_0$  y  $K_{Cx-DBT}$  obtenido para el ensayo RBT-M-2.**

Como puede observarse, la velocidad específica inicial máxima fue la obtenida para DBT, siendo de  $9.10 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$  y de  $1.12 \cdot 10^{-2}$  y  $1.57 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ , para 4MDBT y 4,6DMDBT. La mayor constante cinética se obtiene para DBT, con un valor de  $K_{Cx-DBT}$  de  $9.08 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , siendo inferiores tanto para 4MDBT como para 4,6DMDBT, obteniéndose valores de  $2.28 \cdot 10^{-4}$  y de  $1.20 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  respectivamente.

Los rendimientos de conversión correspondientes para DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT, fueron de 29.22, 20.47 y 27.31 % respectivamente. Sin embargo, no todos

ellos tienen la misma concentración de partida, siendo mucho más elevada para DBT, el cual incluso a pesar de ser el compuesto mayoritario en la mezcla, es el que mayor rendimiento de desulfuración obtiene, degradando 36.45  $\mu\text{M}$  de compuesto frente a 14.45 y 13.45  $\mu\text{M}$  correspondientes a 4MDBT y a 4,6DMDBT.

La simulación de los datos experimentales de la degradación de DBT, 4MDBT y de 4,6DMDBT en el ensayo RBT-M-2, se muestra en la figura 4.24.



**Figura 4.24.** Evolución de los datos experimentales de la degradación de Cx-DBT en el ensayo RBT-M-2.

A tiempo inicial, el consumo DBT es muy rápido, disminuyendo de forma importante la velocidad de degradación a partir de los 50 minutos de reacción. En el caso de 4MDBT y de 4,6DMDBT, se observa como la velocidad de consumo es mucho menor a tiempos iniciales, por lo que esta mucho más favorecido el consumo de DBT.

Se han encontrado muy pocos trabajos de BDS de muestras reales de hidrodesulfurado procedente del proceso de hidrodesulfuración de diesel, realizados a escala de agitador orbital y de biorreactor, y en la cual su composición varía según la etapa y el proceso de hidrodesulfuración realizado en cada caso.

A escala de agitador orbital, Guo-Quiang y col., 2008, utilizan una muestra real de hidrodesulfurado con una concentración total de azufre de 1.26 g/L, y en el cual

utilizan como biocatalizador una mezcla de 13.6 g/L de *Rhodococcus erythropolis* DS-3 y de *Gordonia* sp. C-6, capaces de degradar los compuestos derivados de DBT y BT respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraban como a las 24 horas de reacción y tras tres ciclos de biodesulfuración, conseguían eliminar el 86% de azufre total.

De la misma forma, Goubin y col., 2006, realizaron experimentos de desulfuración de una muestra previamente hidrodesulfurada con una concentración inicial de 591 mg/L de azufre total, en agitador orbital en condiciones de *resting cell*, en una proporción de fases 1:3, añadiendo una OD<sub>600</sub> de 55 de *Pseudomonas delafieldii* R-8. La velocidad de desaparición de azufre total en la mezcla 4 horas de reacción fue de 0.32 mgS/g<sub>biomasa</sub> h.

Otros autores han realizado la biodesulfuración de compuestos procedentes del proceso de hidrodesulfuración de diesel utilizando distintos tipos de biorreactores. Mukhopadhyaya y col., 2006, llevaron a cabo la biodesulfuración de un hidrodesulfurado con una concentración de azufre total de 200 540 ppm, utilizando como biocatalizador *Rhodococcus* sp. inmovilizados en un biorreactor de lecho fijo, y en el cual obtuvieron una conversión del 99%, en condiciones de crecimiento.

Otros autores también han llevado a cabo la desulfuración de un hidrodesulfurado, en condiciones de crecimiento, pero utilizando un biorreactor tipo tanque agitado. Guobin y col., 2006, llevaron a cabo experimentos con una muestra hidrodesulfurada de 591 mg/l de azufre total, en tanque agitado de 5L, utilizando como biocatalizador *P. delafieldii* R-8, con una OD<sub>600</sub> de 55, y con una relación fase acuosa-fase orgánica 6:1, obteniendo tras 16 horas, un 47% de desaparición de azufre en la muestra.

Por otro lado, Folsom y col., 1999 realizaron experimentos en *resting cell* en tanque agitado de 2L, utilizando 12.5 g/L de *Rhodococcus erythropolis* I-19 y una fase orgánica formada por un hidrodesulfurado de 1850 ppm de compuestos Cx-DBT de distinto grado de alquilación, disueltos en hexadecano, en una proporción 3:1. Las condiciones de operación fueron de 30°C, 1000 rpm, y un caudal de aire de 0.4 mL/min y un tiempo de reacción de 24 horas. Los resultados obtenidos mostraban como las

mayores velocidades específicas máximas de degradación se obtenían para los compuestos con menor grado de alquilación. Del mismo modo, se observaba como los valores de  $K_m$  aumentaban cuando el grado de alquilación de los sustituyentes era mayor, disminuyendo así la susceptibilidad de ser atacados por el microorganismo.

## **CAPÍTULO 5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE *RESTING-CELL***

<b>5.1. EFECTO DE LA ADICIÓN DE SURFACTANTES SOBRE EL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN.....</b>	<b>212</b>
<b>5.1.1. Estudio del efecto de la adición de surfactantes en <i>resting-cell</i> en fase acuosa .....</b>	<b>217</b>
<b>5.1.2. Estudio del efecto de la adición de surfactantes en <i>resting-cell</i> en fase orgánica.....</b>	<b>220</b>
<b>5.1.3. Efecto de Tween 85 en la cinética de la ruta 4S en medio bifásico .....</b>	<b>225</b>
<b>5.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE UNA FUENTE DE CARBONO ADICIONAL.....</b>	<b>228</b>
<b>5.2.1. Estudio de la adición de cosustratos en medio acuoso .....</b>	<b>230</b>
<b>5.2.2. Estudio de la adición de cosustratos en medio bifásico.....</b>	<b>235</b>
<b>5.3. REUTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EN <i>RESTING CELL</i>.....</b>	<b>237</b>
<b>5.3.1. Estudio de la viabilidad celular en condiciones de <i>resting cell</i> .....</b>	<b>238</b>
<b>5.3.2. Estudio de la reutilización de <i>P. putida</i> CECT5279 en condiciones acuosas .....</b>	<b>240</b>
<b>5.4. EFECTO DE LA EDAD DEL BIOCATALIZADOR SOBRE EL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN EN CONDICIONES BIFÁSICAS .....</b>	<b>245</b>
<b>5.5. DESULFURACIÓN DE DBT EN <i>RESTING CELL</i> EN TANQUE AGITADO EN CONDICIONES BIFÁSICAS: EFECTO DEL OXÍGENO.....</b>	<b>250</b>
<b>5.5.1. Caracterización del consumo de oxígeno de <i>P. putida</i> CECT5279 en <i>resting cell</i> en condiciones bifásicas.....</b>	<b>250</b>
<b>5.5.2. Efecto del suministro de aire en el proceso de biodesulfuración en <i>resting cell</i> en condiciones bifásicas en tanque agitado.....</b>	<b>254</b>



Uno de los principales problemas que se encuentran al llevar a cabo la reacción de biodesulfuración en un sistema bifásico en la que se utiliza una elevada fracción orgánica, es la transferencia de DBT y de Cx-DBT desde la fase orgánica hasta el interior celular. Debido a la baja solubilidad de DBT y de Cx-DBT en la fase acuosa, es necesario optimizar las condiciones de la mezcla para de ese modo obtener un mayor transporte entre fases, aumentando la biodisponibilidad del microorganismo.

Este problema se puede abordar de distintas formas, como incrementar la velocidad de agitación del proceso o bien añadiendo surfactantes y codisolventes, que mejoren el proceso de transferencia de DBT y de los compuestos Cx-DBT.

En este capítulo se va a estudiar el efecto de la adición de distintos surfactantes y codisolventes, con el objetivo de mejorar el proceso de biodesulfuración de DBT, tomado como compuesto modelo, disminuyendo así los problemas de transferencia existentes en condiciones bifásicas a escala de incubadora orbital.

Por otra parte, para mejorar la actividad enzimática del biocatalizador y de ese modo obtener mejores rendimientos de desulfuración, se ha estudiado el efecto de la adición de una fuente de carbono adicional. De forma, que puedan incorporarse al ciclo de Krebs, y una vez metabolizadas generen equivalentes reducidos, que posteriormente sean incluidos en la ruta 4S, de forma que aporten poder reductor adicional, reactivando la maquinaria enzimática del biocatalizador y mejorando así, la capacidad desulfurante en condiciones acuosas y bifásicas.

Relacionado con el estudio anterior, se ha estudiado la pérdida de la actividad de desulfuración de *P. putida* CECT5279 al someterlo a sucesivos ciclos de biodesulfuración, con el objetivo de determinar el grado de reutilización del biocatalizador en condiciones de *resting cell* en condiciones acuosas y en el cual se ha estudiado el efecto de la adición de piruvato sobre la capacidad desulfurante en el proceso de reutilización.

En otro apartado del capítulo, se ha realizado un estudio de la influencia de la edad celular del biocatalizador sobre el proceso de biodesulfuración de DBT y de compuestos Cx-DBT en condiciones bifásicas de *resting cell*. A pesar de estar ampliamente estudiado en condiciones acuosas, se ha pretendido ratificar el comportamiento observado en dichas condiciones.

Por último, se ha estudiado la influencia del suministro de oxígeno en el proceso de desulfuración de DBT en *resting cell* en medio bifásico, en tanque agitado. La concentración de oxígeno disuelto en el biorreactor es uno de las variables más importantes en los procesos aerobios, debido a que el oxígeno es un nutriente esencial que puede controlar el metabolismo de los microorganismos. Por esa razón, se optimizaron las condiciones de aireación durante el proceso de biodesulfuración a escala de tanque agitado.

En este capítulo se pretende por tanto, optimizar las condiciones de operación del proceso de biodesulfuración en un sistema bifásico, utilizando como escala de trabajo, agitador orbital y tanque agitado. Aquellas condiciones que mejoran el proceso, han sido utilizadas en las reacciones de biodesulfuración de DBT y Cx-DBT realizadas en el capítulo 4 en condiciones bifásicas.

### ***5.1. EFECTO DE LA ADICIÓN DE SURFACTANTES SOBRE EL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN***

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Caro y col., 2008; Caro II y col., 2008), estos han demostrado que las reacciones de biodesulfuración en *resting cell* en medio acuoso de *P.putida* CECT5279 resulta más efectiva incluso que otras cepas como *R. erythropolis* IGTS8, para realizar la conversión de DBT. Según estos resultados se concluye que *P.putida* CECT5279 es menos sensible que *R. erythropolis* IGTS8 a los procesos de inhibición detectados en reacciones de biodesulfuración en medio acuoso.

Además, se ha encontrado que los procesos de BDS en *resting cell* en condiciones bifásicas, el proceso limitante es la transferencia de materia, siendo este efecto más pronunciado en *P.putida* CECT5279. Se supone que este comportamiento es debido a la distinta capacidad de los microorganismos de adherirse a la interfase agua-aceite. *P.putida* CECT5279 es un microorganismo Gram negativo y *R. erythropolis* IGTS8 es Gram positivo. La membrana externa de los microorganismos Gram negativo está formada por una bicapa lipídica con una capa externa formada por lipopolisacáridos y proteínas. Esta estructura está rodeada a su vez, por una fina capa de peptidoglicano y esto confiere a la membrana citoplasmática de *P.putida* CECT5279, una mayor afinidad por la fase acuosa.

Por otro lado, la solubilidad del DBT en agua, es la más baja de todos los compuestos de la ruta 4S, de tan solo de 1 mg/L, mientras que la solubilidad del DBTO es de 320 mg/L a 25 °C (Seymour y col., 1997).

Si se consideran los dos efectos, el producido por la estructura de la membrana plasmática de *P.putida* CECT5279, y por otro lado, la baja solubilidad de DBT, son dos barreras importantes para el desarrollo del proceso de biodesulfuración en condiciones bifásicas.

Otros autores han llegado a la misma conclusión. Maghsoudi y col., 2001 y Marcelis y col., 2003, en sus estudios con diferentes cepas de *Rhodococcus* sp. en los cuales revelan que la baja difusión de DBT desde la fase orgánica a la fase acuosa es uno de los problemas más importantes en el proceso de desulfuración. Luo y col., 2003, observaron el mismo problema cuando utilizaban especies de *Pseudomonas* en un modelo orgánico de desulfuración.

Más recientemente, Jia y col., 2006, propusieron un modelo matemático para simular sus datos experimentales de la degradación de DBT, considerando la resistencia de la transferencia de materia en la interfase agua-aceite. Los experimentos fueron realizados en tanque agitado con *Gordonia* sp. (Bacteria Gram positiva), con una fracción baja de fase orgánica (20% v/v), con alta concentración de DBT (5mM en fase orgánica) y alta densidad celular (20 g<sub>biomasa</sub>/L). Observaron que había una relación

entre el paso limitante bioquímico y el proceso físico de transporte, dependiendo de la proporción de fase orgánica, DBT y la concentración celular.

En general, muchos autores reconocen que la baja solubilidad de DBT en la fase acuosa y su capacidad de ser transportado al interior celular es el paso limitante del proceso de biodesulfuración en medio bifásico. Sin embargo, debido a las diferentes condiciones de operación, así como la variedad de biocatalizadores utilizados es muy difícil encontrar una explicación sobre cual es realmente el paso limitante. Sin embargo, como los problemas de transporte siempre aparecen, será la etapa física la que esté claramente desfavorecida.

Una manera de facilitar el contacto entre el DBT, disuelto en fase orgánica, y el microorganismo, presente en la fase acuosa, es aumentando la solubilidad del compuesto azufrado en la fase acuosa añadiendo un codisolvente en el medio (Wang y Kraview, 1996; Yan y col., 2000). Por otro lado, la adición de cualquier disolvente orgánico como alcohol, dimetil sulfóxido, dimetil formamida o similar, puede ser beneficioso para la estabilidad de la emulsión pero puede ser peligroso para la integridad de la célula, pudiendo resultar tóxico. Del mismo modo, se sabe que los surfactantes pueden aumentar la solubilidad de sustancias hidrofóbicas en agua, así como su biodisponibilidad, por la formación de micelas reversas que aumentan la superficie de contacto entre los líquidos inmiscibles en la interfase, mejorando el contacto de DBT con el microorganismo (Déziel y col., 1999; van Hamme y Ward, 2001).

El uso de surfactantes químicos esta muy extendido en procesos de bioremediación, y extensamente verificado y reportado en bibliografía (Komives y col., 1994; Wong y col., 2004; Yu y col., 2007; Tsai y col., 2009). La aplicación de tecnologías de bioremediación de hidrocarburos en suelos esta frecuentemente limitada debido a la presencia de compuestos recalcitrantes con baja solubilidad y alta hidrofobicidad, los cuales hacen que se encuentren en baja disponibilidad respecto del microorganismo utilizado en biodegradación.

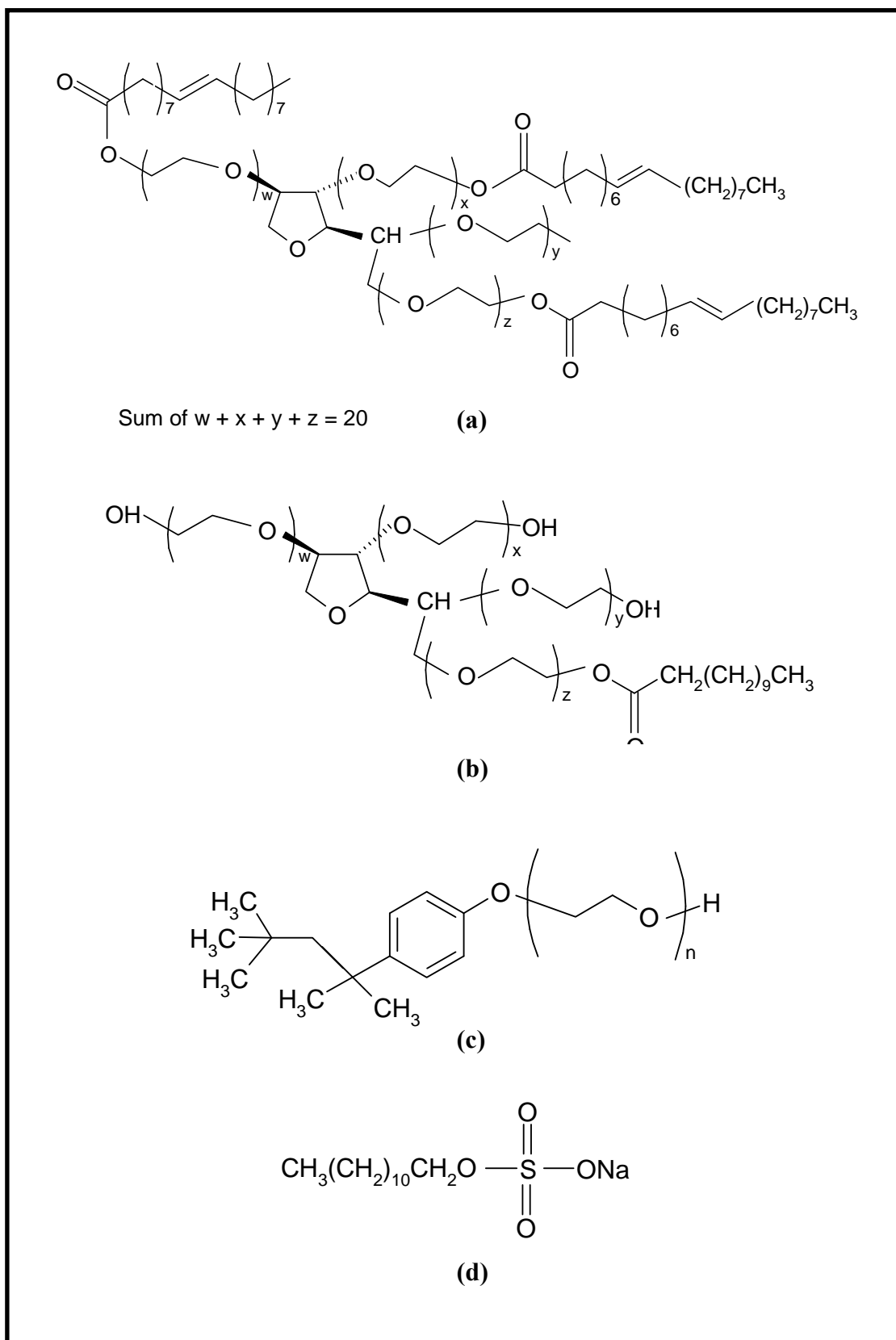
Se han reportado en bibliografía muchas aplicaciones de surfactantes en bioremediación de suelos, pero puede obtenerse diferentes efectos del mismo surfactante sobre la actividad del microorganismo. Un surfactante puede beneficiar el proceso de biodegradación o bien puede ser un inhibidor, por lo que es necesario ensayar el surfactante antes de ser añadido en el medio de reacción (Harwell y col., 1999; Kim y col., 2001; Mulligan y col., 2001).

En biodesulfuración, solo hay un estudio en el cual se utiliza un surfactante. Feng y col., 2006 reportaron el uso de Tween 80 para procesos de BDS con crecimiento celular de *Rhodococcus erythropolis* 1awq en fase acuosa. En este trabajo, los autores atribuyen el efecto positivo del surfactante a la reducción de la concentración de HBP asociada a las células por la formación de micelas reversas, reduciendo de ese modo la inhibición por producto causada por este compuesto.

El propósito de este estudio es la selección del surfactante más adecuado para ser añadido al medio bifásico, de forma que se mejore el rendimiento de desulfuración obtenido con *P.putida* CECT5279, debido a que de ese modo, se reducen los problemas de transporte entre la fase orgánica y el interior celular.

En primer lugar, se ha probado con distintos surfactantes químicos (iónicos y no iónicos) para determinar la concentración y el surfactante más adecuado. En segundo lugar, una vez determinado el surfactante y la dosis óptima, se estudió su efecto sobre la cinética en el proceso de biodesulfuración de DBT, en un medio de reacción acuoso y bifásico.

Se ensayaron los siguientes surfactantes: No iónicos: Tween 20, Tween 85 y Tritón X-100 y Aniónicos: dodecil sulfato sódico (SDS) y etanol, que se utilizó como codisolvente. Las estructuras químicas se muestran en la figura 5.1.



**Figura 5.1. Estructura química de los surfactantes usados en este trabajo: (a) Tween 85; (b) Tween 20; (c) Triton X-100 y (d) Dodecil sulfato sódico.**

Los compuestos Tween 20 y Tween 85 son polisorbatos y Tritón X-100 es un alcohol etoxilado. Triton X-100, Tween 20 y Tween 85 son surfactantes biodegradables con un balance hidrofílico/ hidrófobo (HLB) de 13.5, 16.7 y 11 respectivamente. Este indica que pueden formar micelas reversas en medio acuoso debido a su alta hidrofobicidad. Las micelas reversas son consideradas como fluidos a esta temperatura (Komives y col., 2000). Por otro lado, SDS es habitualmente utilizado como permeabilizador de membranas.

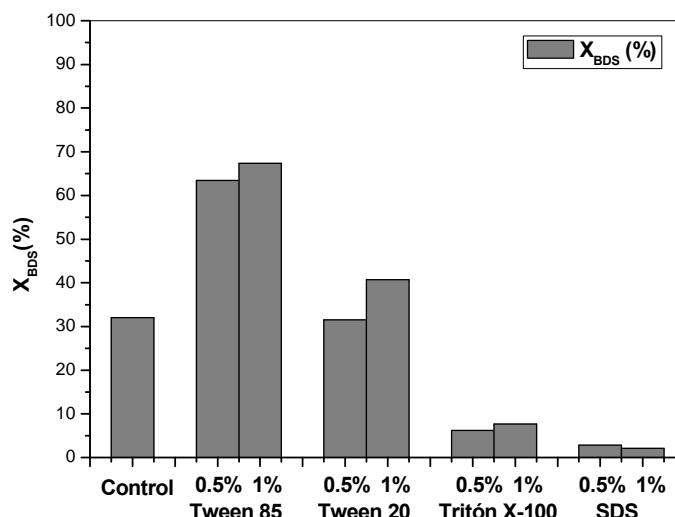
El biocatalizador utilizado para realizar los distintos ensayos, tanto en condiciones acuosas como bifásicas, fue producido en tanque agitado de 2L, con una edad de crecimiento de 12 horas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.3.

#### ***5.1.1. Estudio del efecto de la adición de surfactantes en resting cell en un sistema acuoso***

En primer lugar se estudio el efecto de la adición de surfactantes sobre el proceso de biodesulfuración de DBT de *P. putida* CECT5279 en condiciones de *resting cell* en medio acuoso.

Los ensayos de biodesulfuración en medio acuoso fueron realizados por triplicado, en Erlenmeyer de 100 mL con un volumen total de 5 mL. Las condiciones de operación en todos los ensayos fueron de 30°C y 250 rpm durante 3 horas de reacción. La fase acuosa utilizada estaba compuesta por 12 g/L de HEPES pH 8, 1 g<sub>biomasa</sub>/L de *P. putida* CECT5279 y 25 µM de DBT disuelto en etanol. Las cantidades de surfactante añadido fueron de 0.5 y 1 % (v/v) en cada ensayo. Los surfactantes utilizados fueron Tween 20, Tween 85, Tritón X-100 y SDS.

En la figura 5.2 se recogen los resultados de  $X_{BDS}$  obtenidos para los ensayos de biodesulfuración realizados en *resting cell* en medio acuoso, utilizando *P. putida* CECT5279 añadiendo los surfactantes Tween 85, Tween 20, Tritón X-100 y SDS.



**Figura 5.2.** Valores de  $X_{BDS}$  obtenidos para los ensayos de biodesulfuración realizados en condiciones de *resting cell* en medio acuoso utilizando *P.putida* CECT5279 como biocatalizador, añadiendo distintos surfactantes: Tween 85, Tween 20, Tritón X-100 y Dodecil sulfato sódico.

De los resultados mostrados en la en la figura 5.2, puede observarse como los mejores resultados obtenidos de  $X_{BDS}$  le corresponden al ensayo en el que se ha adicionado el surfactante Tween 85, alcanzando un valor de 63.42 y 67.39 %, para las dosis ensayas de 0.5 y 1% (v/v) correspondientemente.

En el ensayo en el que se adicionó el surfactante Tween 20 se consiguió mejorar el rendimiento  $X_{BDS}$  sólo para la dosis ensayada más alta, obteniéndose un valor de 40.73%. En cambio, para la dosis de 0.5% (v/v) no se obtuvieron mejores valores que en el caso del ensayo control.

En los ensayos en los que se utilizó Tritón X-100 y SDS como surfactantes, se obtuvieron valores de  $X_{BDS}$  muy por debajo de los obtenidos en el ensayo control, para todas las dosis ensayadas. Con estos resultados, queda claro el efecto tóxico que estos compuestos ejercen sobre el biocatalizador. Por lo tanto, el surfactante Tween 85 utilizado en una dosis de 1% (v/v) consigue mejorar el proceso de biodesulfuración, aumentando hasta en dos veces los valores de  $X_{BDS}$  obtenidos en el ensayo control, siendo este el mejor de todos los surfactantes de ensayados.



Por otra parte, en la tabla 5.1 se muestran las velocidades específicas iniciales de desaparición de DBT y de aparición de HBP para los ensayos en los que se han utilizado distintos surfactantes.

Emulsionante	$v_0$ DBT ( $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$ )	$v_0$ HBP ( $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$ )
Control	0,133	0,044
Tween 85 (1% v/v)	0,123	0,093
Tween 85 (0,5% v/v)	0,138	0,088
Tween 20 (1% v/v)	0.126	0.054
Tween 20 (0,5% v/v)	0.137	0.030
Tritón X-100 (1% v/v)	0.025	0.011
Tritón X-100 (0,5% v/v)	0.018	0.009
SDS (1% v/v)	0.106	0.003
SDS (0,5% v/v)	0.125	0.013

**Tabla 5.1.** Valores de las velocidades específicas de desaparición de DBT y de aparición de HBP, correspondientes a los ensayos de biodesulfuración realizados en condiciones de resting cell en medio acuoso utilizando *P.putida* como biocatalizador, añadiendo distintos surfactantes.

Las velocidades iniciales específicas de desaparición y aparición de DBT y HBP respectivamente, han sido obtenidas en los primeros 60 minutos de reacción, con una conversión de DBT del 10%.

Como puede apreciarse, para los ensayos en los que se ha utilizado Tween 85, y de forma independiente a la dosis utilizada, se obtienen velocidades de desaparición de DBT muy similares a las obtenidas en el ensayo control, obteniéndose valores de 0.123 y 0.138  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$  para DBT en los ensayos con 0.5 y 1% (v/v) Tween 85. En cambio, las velocidades iniciales específicas de aparición de HBP, son muy superiores respecto del ensayo control, obteniéndose valores de 0.088 y 0.093  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$  para los ensayos de 0.5 y 1% (v/v) de Tween 85 respectivamente, frente a 0.044  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$  obtenida en el ensayo control. Los mayores rendimientos de desulfuración se obtuvieron para el ensayo en el que se adicionó 1%

(v/v) de Tween 85 con un 67.39%, el cual aumenta el valor de  $X_{BDS}$  en un 52% respecto del ensayo control.

Las velocidades específicas de conversión de DBT obtenidas para el ensayo en el que se adicionó Tween 20 como surfactante, son muy similares a las obtenidas en el ensayo control y en aquellos ensayos en los que se usó Tween 85, independientemente de la dosis ensayada. En cambio las velocidades iniciales de producción de HBP obtenida para los ensayos con Tween 20, son inferiores a las obtenidas en los ensayos en los que se añadió Tween 85, obteniéndose valores de 0.0309 y 0.0545  $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}}$  min, para los ensayos de 0.5 y 1% (v/v) de Tween 20 añadido.

Debido al elevado efecto tóxico provocado por los surfactantes Tritón X-100 y SDS, no sólo se obtienen bajos rendimientos de desulfuración, sino que las velocidades específicas obtenidas para ambos, en cualquiera de las dosis empleadas, tanto para DBT como para HBP, son muy inferiores a las velocidades obtenidas en el ensayo control.

#### ***5.1.2. Estudio del efecto de la adición de surfactantes en resting cell en un sistema bifásico***

Del mismo modo que en los ensayos realizados en medio acuoso, se realizó el estudio de la influencia de la adición de diferentes surfactantes en el medio de reacción en condiciones bifásicas. En primer lugar se evaluó el efecto sobre la capacidad de desulfuración del codisolvente y de los surfactantes añadidos por separado en el medio de reacción.

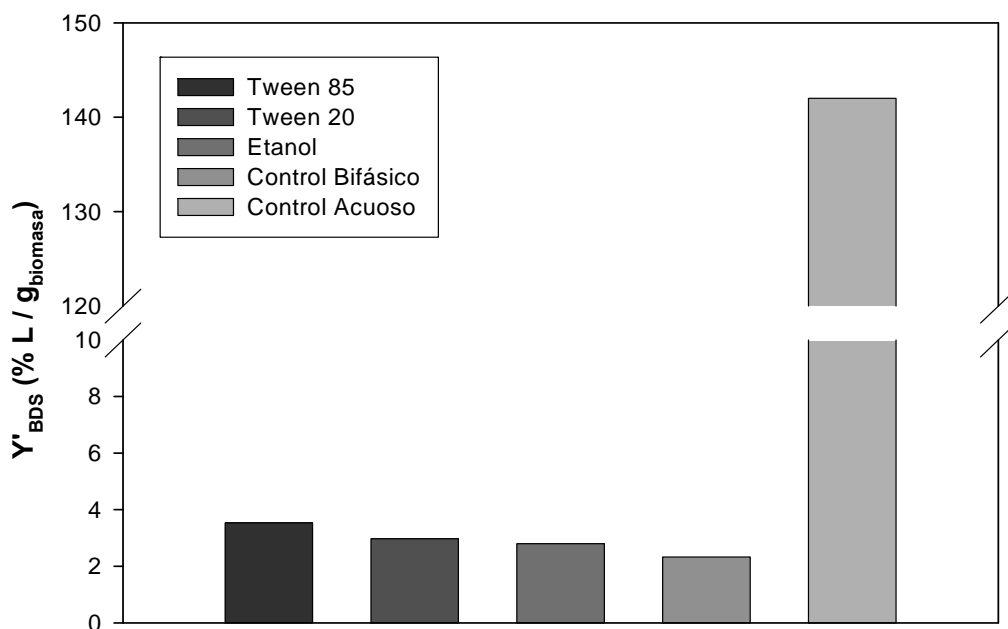
Los ensayos de biodesulfuración en medio bifásico fueron realizados por triplicado, en Erlenmeyer de 100 mL con 5 mL de volumen total. Las condiciones de operación en todos los ensayos fueron de 30°C y 250 rpm durante 24 horas de reacción. La fase acuosa utilizada estaba compuesta por 12 g/L de HEPES pH=8, 15  $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{L}$  de *P. putida* CECT5279 y la fase orgánica empleada estaba compuesta por 271  $\mu\text{M}$  de DBT disuelto en hexadecano, y la relación de fase acuosa-orgánica se ha mantenido en

un ratio 1:1. En este ensayo la cantidad de surfactante añadido fue de 0.2 % (v/v). Los surfactantes utilizados fueron: Tween 20, Tween 85, Tritón X-100 y SDS.

Para evaluar el efecto de los surfactantes en la reacción de biodesulfuración en los sistemas acuosos y bifásicos, se ha utilizado el parámetro  $Y'_{BDS}$  o rendimiento de desulfuración específico, definido como la relación de 2HBP producido respecto de la concentración inicial de DBT en un tiempo determinado de reacción y dividido entre la concentración de biomasa ( $C_x$ ). Las concentraciones de DBT y 2HBP se expresan en  $\mu\text{mol/L}$ , y la  $C_x$  en  $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{L}$ . Por tanto,  $Y'_{BDS}$  se expresa en porcentaje por gramo de biomasa, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$Y'_{BDS} = 100 \cdot \left( \frac{2HBP}{DBT} \right) \frac{1}{C_x} \quad (5.1)$$

La figura 5.3 muestra los rendimientos de desulfuración específicos  $Y'_{BDS}$ , correspondientes al ensayo control acuoso y a los ensayos bifásicos en los que se adicionado Tween 85, Tween 20 y etanol, así como de los correspondientes ensayos control realizados en condiciones acuosas y bifásicas.



**Figura 5.3. Rendimientos de desulfuración específicos,  $Y'_{BDS}$ , obtenidos con la adición de un codisolvente (etanol) y diferentes surfactantes.(Tween 85 y Tween 20).**

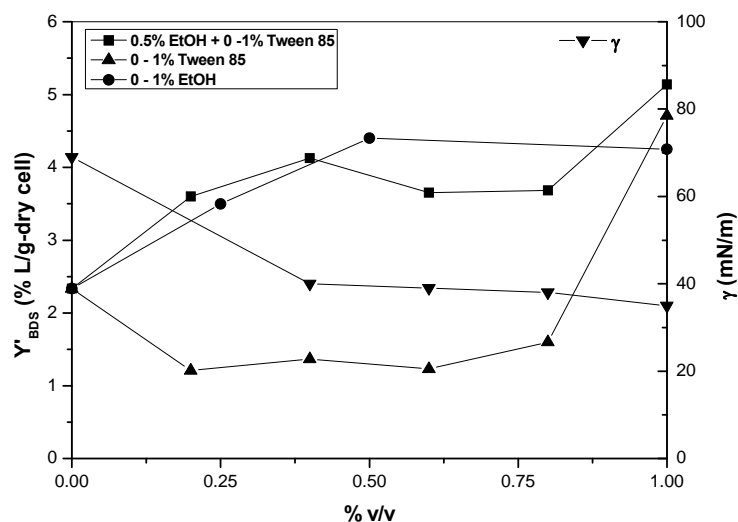
De estos resultados puede observarse, como el valor de  $Y'_{BDS}$  en medio acuoso es extremadamente grande comparado con los valores obtenidos en presencia de la fase orgánica, obteniendo un valor de  $142 \text{ } \frac{\% \cdot L}{g_{\text{biomasa}}}$ . Sin embargo, la capacidad desulfurante alcanzada de *P. putida* CECT5279 se ve incrementada con la adición de 0.5% v/v de etanol como codisolvente, o de la adición de Tween 20 y Tween 85. La adición de Tritón X-100 y SDS, produce una emulsión muy estable que no pudo ser separada por centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos, y debido a este hecho, no se pudo realizar el análisis por HPLC.

Por tanto, se observa como el Tween 85 es el mejor surfactante, debido a que mejora el rendimiento de desulfuración específico  $Y'_{BDS}$  entre un 20% frente a un 7% respecto de la mejora obtenida con el uso de Tween 20, ambos comparados con el  $Y'_{BDS}$  obtenido por el ensayo bifásico control, al cual no se le ha añadido ningún surfactante.

Considerando los resultados obtenidos por la adición de los compuestos individualmente, Tween 85 es mejor que los otros surfactantes ensayados, debido a que se consigue el mayor  $Y'_{BDS}$ . Además, la estabilidad de la emulsión es suficiente para medir la tensión superficial, permitiendo separar las fases, para llevar a cabo una posible reutilización de la biomasa.

Se considero necesario el estudio del efecto sinérgico o antagónico que se pudiera producir en la mezcla compuesta por Tween 85 y etanol. Para optimizar la dosis de estos compuestos, se planearon experimentos en *resting cell* usando Tween 85 y etanol por separado y mezclados, en distintas proporciones en un medio bifásico de reacción.

En la figura 5.4 se muestran los rendimientos de desulfuración específicos alcanzados en una reacción de *resting cell* en las que se ha añadido Tween 85 solo y en mezclado con etanol. En la misma figura se muestra la evolución de la tensión superficial medida en distintos medios a los que se le ha añadido diferentes proporciones de Tween 85.



**Figura 5.4.** Rendimientos de desulfuración específicos alcanzados en una reacción de *resting cell* añadiendo Tween 85 solo y en mezclas con etanol. Evolución de la tensión superficial con distintas proporciones de Tween 85 añadidas al medio de reacción.

Como puede observarse en la figura 5.4, el valor de conversión de DBT se ha mantenido constante entre 0.2 y 0.8 % (v/v) de Tween 85. Sin embargo, el máximo valor obtenido ha sido alcanzado con la adición de 1% (v/v) de Tween 85, alcanzando un valor de  $Y'_{BDS}$  de 4.71%·L/g<sub>biomasa</sub>.

El uso de etanol produce una mejora en el rendimiento de desulfuración en todo el rango de dosis añadidas respecto del ensayo control bifásico, obteniéndose el mejor resultado de desulfuración para la dosis de etanol de 0.5 % (v/v), con un valor de  $Y'_{BDS}$  de 4.4 %·L/g<sub>biomasa</sub>. Sin embargo, se va a obtener un menor rendimiento de  $Y'_{BDS}$  que los obtenidos en los ensayos en los que se ha añadido Tween 85.

Por otro lado, la mezcla de surfactante y alcohol es la mejor opción, obteniéndose un  $Y'_{BDS}$  de 5.14 %·L/g<sub>biomasa</sub>, el cual es el mejor resultado obtenido comparado con los resultados obtenidos en los ensayos en los que se ha utilizado Tween 85 o etanol de manera individual en su dosis más óptima. Los resultados indican que la adición combinada de 1% (v/v) de Tween 85 y 0.5% (v/v) de etanol es la proporción más adecuada que permite para alcanzar el máximo valor de  $Y'_{BDS}$  en un sistema bifásico.

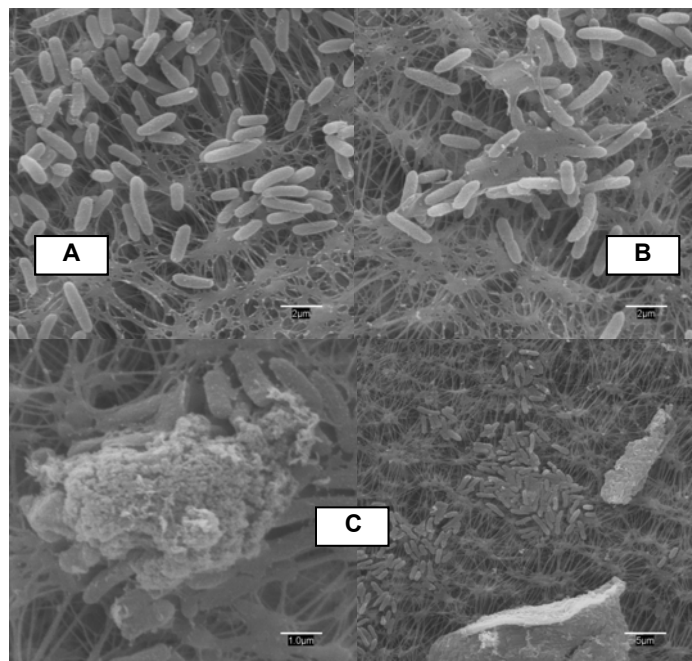
La medida de la tensión superficial indica que existe una relación entre el incremento de  $Y'_{BDS}$  por la adición de Tween 85 y la reducción de la tensión superficial en el medio bifásico de reacción, observándose que la adición del surfactante mejora los rendimientos de desulfuración.

Con el objetivo de estudiar si la adición del surfactante, alcohol y hexadecano podían producir una alteración morfológica en la célula, se recogieron células en el tiempo final de reacción de la reacción de *resting cell* y fueron analizadas por microscopia electrónica de barrido (SEM).

La figura 5.5 muestra las fotografías obtenidas por SEM de la bacteria *P. putida* CECT5279 una vez se pusieron en contacto con disolventes orgánicos (etanol y hexadecano) y Tween 85, y se observó que no existía una alteración morfológica aparente en la células del biocatalizador.

En la figura 5.5(c) se detectó la formación de una capa que unía las células en presencia de la mezcla formada por hexadecano y Tween 85, y que según reveló la técnica SEM, correspondía a la formación de agregados de estructura sólida en la superficie de las células.

Esta recogido en bibliografía que la especie *Pseudomonas* puede producir polisacáridos extracelulares, llamados exopolisacáridos (EPS) (De Castro y col., 2001; Kachlany y col., 2001; Sudhamani y col., 2004). La producción de este polisacárido es una propiedad común de este tipo de bacterias y se cree que su función es la de proteger a las células frente a condiciones adversas (deshidratación, compuestos orgánicos, metales pesados) y la de producir biopelículas (Onbasli y Aslim, 2009; Pársec y Tolker-Nielsen, 2008).



**Figura 5.5.** Células recogidas de un reacción de resting cell: (A) Medio acuoso con tampón HEPES y 0.5% etanol; (B) Medio bifásico con C16 y tampón HEPES; (C) Medio bifásico con C16, tampón HEPES y Tween 85.

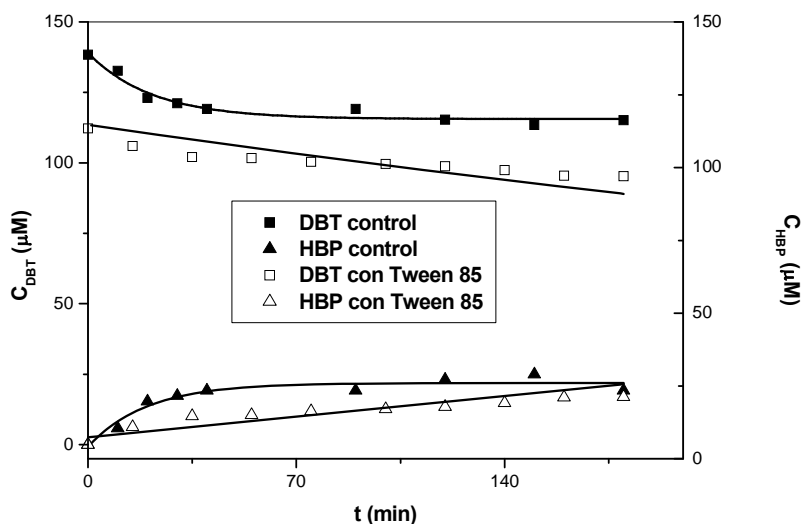
### **5.1.3. Efecto de Tween 85 en la cinética de la ruta 4S en medio bifásico**

La cinética de desulfuración de *P. putida* CECT5279 ha sido previamente descrita por varios autores en medio acuoso y bifásico en condiciones de *resting cell* (Caro y col., 2008 y Calzada y col., 2009). En medio acuoso, el proceso de biodesulfuración ha sido bien simulado utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. Pero en presencia de hexadecano en una proporción de 50%, los parámetros cinéticos obtenidos por este método no son válidos, como se ha demostrado en el capítulo 4.3, debido probablemente a los problemas de transferencia de materia que se producen.

En este apartado, se ha determinado la constante cinética para DBT ( $K_{DBT}$ ) en presencia de Tween 85, para evaluar si la presencia del surfactante afecta al proceso cinético global. Estos coeficientes cinéticos, se han obtenido por el método integral descrito en el apartado 4.2.2.

Para la determinación de  $K_{DBT}$  en presencia de Tween 85 y etanol, se realizaron ensayos de biodesulfuración en un sistema bifásico, los cuales fueron realizados por triplicado en Erlenmeyer de 250 mL y con 50 mL de volumen total. Las condiciones de operación en todos los ensayos fueron de 30°C y 250 rpm durante 3 horas de reacción.

La fase orgánica estaba formada por 108  $\mu\text{M}$  de DBT disuelto en hexadecano y la fase acuosa utilizada estaba compuesta por 12 g/L de HEPES a pH=8, 10 g/L de *P. putida* CECT5279 al que se añadió 0.5 % (v/v) de etanol y 1 % (v/v) de Tween 85, en proporción 1:1. Asimismo se llevó a cabo el correspondiente ensayo control, en el que no se adicionó Tween 85 ni etanol. La evolución de la desaparición de DBT y de aparición de HBP, correspondiente a estos ensayos se muestra en la figura 5.6.



**Figura 5.6.** Evolución de las concentraciones de DBT y HBP correspondientes al ensayo control y con Tween 85, realizados en *resting cell* en medio bifásico, utilizando como biocatalizador *P. putida* CECT5279.

Es importante recordar que la evaluación de la constante cinética es posible únicamente si existe proceso bioquímico, debido a la baja solubilidad de DBT en la fase acuosa, la cual tiene una concentración de saturación muy baja. Por tanto, el consumo de DBT es absolutamente necesario para crear un gradiente para que se dé el transporte de masa.



Por otro lado, puede considerarse que la reacción se produce en la fase acuosa, y como la reacción es muy rápida, la concentración de DBT y de los intermedios de la ruta 4S estará próxima a cero, por lo que será muy complicado analizarla por HPLC, ya que se encontrará cercano al límite de detección. Debido a esto, el valor de la constante cinética de DBT se ha determinado a partir de la reducción de la concentración de DBT en la fase orgánica.

Se calcularon los correspondientes  $K_{DBT}$  para cada uno de los ensayos, observándose un valor superior en el ensayo en el que se adicionaron Tween 85 como surfactante y etanol como codisolvente. Los valores obtenidos fueron de  $1.35 \cdot 10^{-3}$  y  $2.65 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  para el ensayo control y para el ensayo en el que se adicionó Tween 85 y etanol.

Con estos resultados puede concluirse que el proceso de desulfuración de DBT en fase orgánica se ve favorecido por la acción del surfactante, duplicándose la velocidad global de reacción, sin embargo, en el ensayo en el que se adicionaron Tween y etanol, se obtienen mejores rendimientos de desulfuración, siendo de 48.25 %, frente a 13.89% obtenido en el ensayo control.

Comparando las correspondientes velocidades iniciales de desaparición de DBT en cada uno de los ensayos, obtenidas para los primeros 60 minutos de reacción, se obtuvo que la velocidad inicial de desaparición de DBT, para el ensayo control, fue de  $1.27 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ . En cambio la añadir Tween 85 y etanol, se observa un incremento importante en la velocidad inicial de desaparición de DBT, obteniéndose un valor de  $1.91 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ . Estas velocidades iniciales confirman el gran efecto que tiene la presencia de la mezcla de Tween 85 y etanol sobre la cinética de la reacción de biodesulfuración.

Por lo tanto, el uso de surfactantes consigue aumentar la disponibilidad de DBT en el medio acuoso y favorece la formación de la mezcla entre fases inmiscibles, mejorando el proceso de biodesulfuración.

## **5.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE UNA FUENTE DE CARBONO ADICIONAL**

La ruta metabólica específica para la desulfuración de DBT (ruta 4S), comprende cuatro pasos enzimáticos sucesivos, la cual está catalizada por las enzimas DszC, DszA, DszB y HpaC, en el caso de *P. putida* CECT5279, así como por los cofactores NADH y FMNH<sub>2</sub>, los cuales son imprescindibles para el desarrollo del proceso de biodesulfuración (Ohshiro y col., 1994).

Se ha demostrado, que en las condiciones en la que se lleva habitualmente el proceso de desulfuración, la participación de los cofactores en la ruta 4S presenta la desventaja de no poder ser regenerados a lo largo del proceso de biodesulfuración (Setti y col., 1997).

Sin embargo, otros autores (Luo y col., 2003 y Alcon y col., 2005) llegaron a la conclusión de que el sistema no estaba limitado por el poder reductor, en las reacciones de *resting cell* en medio acuoso utilizando como biocatalizador *P. delafieldii* R-8 y *P. putida* CECT5279 respectivamente.

Debido a que estos estudios no alcanzan un consenso con respecto a la regeneración de los cofactores implicados en el proceso de biodesulfuración de DBT, se ha creído necesario evaluar el efecto de la adición de distintas fuentes de carbono adicionales, en el medio de reacción a distintas concentraciones.

Las fuentes de carbono adicionales seleccionadas fueron piruvato, succinato y citrato de sodio, los cuales forman parte del ciclo de Krebs o ciclo de ácidos tricarboxílicos.

En el ciclo de Krebs, los intermediarios son oxidados completamente a CO<sub>2</sub> generándose ATP y equivalentes reducidos (NADH y FADH<sub>2</sub>) que ingresarán en la cadena respiratoria para poder reoxidarse, de modo que el transporte de electrones que se produce hasta el O<sub>2</sub> generará energía que se utilizará para la síntesis de ATP.

Se baraja la posibilidad que los equivalentes reducidos generados por el aporte de las fuentes de carbono extra entren en el ciclo de Krebs, sean metabolizados produciendo nuevos cofactores y que sean posteriormente incorporados en la ruta 4S, favoreciendo así la actividad enzimática y mejorando la capacidad desulfurante de la bacteria. La figura 5.7 muestra la ruta del ciclo de Krebs, y el destino metabólico de los diferentes sustratos.

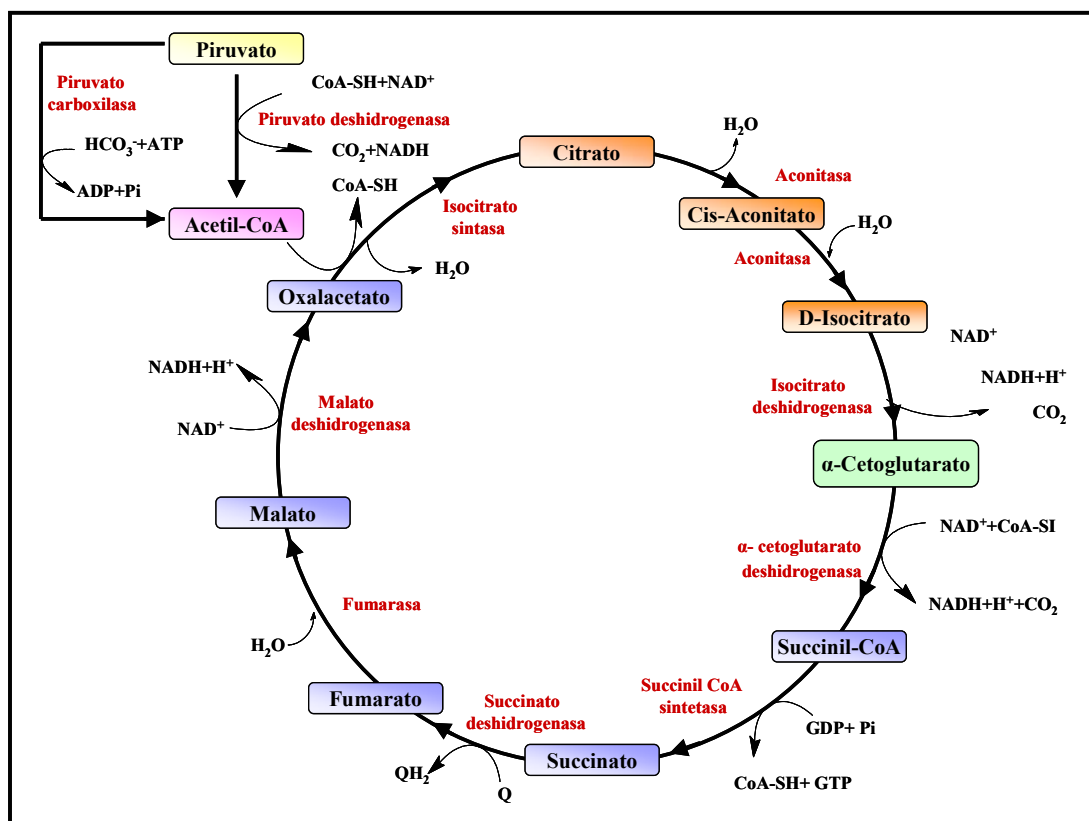


Figura 5.7. Esquema del Ciclo de Krebs

Para estimar la influencia de la adición de una fuente de carbono extra sobre las tres primeras etapas de la ruta 4S, se han utilizado como sustrato DBT y los intermedios DBTO y DBTO<sub>2</sub>, en condiciones acuosas, utilizando como biocatalizador *P. putida* CECT5279.

Posteriormente, una vez determinado el efecto de la fuente de carbono sobre el proceso de BDS en fase acuosa, se han realizado ensayos en condiciones bifásicas con

la fuente de carbono adicional en la que obtenían mejores rendimientos de desulfuración en las condiciones habituales de operación.

### ***5.2.1. Estudio de la adición de cosustratos en medio acuoso***

En la literatura no se han encontrado trabajos en los que se estudie la influencia de la adición de fuentes de carbono en el proceso de BDS en el que se hayan utilizado biocatalizadores en condiciones de *resting-cell*. Tan sólo Klein y col., 1969, estudiaron el efecto de la adición de glucosa como segunda fuente de carbono, en el proceso de degradación de *n*-hexadecano utilizando *Anthrobacter* sp en condiciones de *resting-cell*. En este trabajo, observaron, como la adición de una fuente de carbono adicional, estimulaba la oxidación de la cadena carbonada a través de un mecanismo enzimático. Este mismo efecto fue observado por Madelstam y Jacoby (1965), usando como biocatalizador *Pseudomonas aeruginosa* con este mismo objetivo.

Para determinar la influencia de los cosustratos sobre las distintas etapas del proceso de BDS, se han realizado ensayos utilizando DBT y los intermedios de la ruta 4S, DBTO y DBTO<sub>2</sub>, a los cuales se añadieron distintos tipos y dosis de cosustrato.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en *resting cell* en medio acuoso, en el cual el medio de reacción estaba compuesto por 25 µM de DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub> disueltos en etanol, tampón Hepes a pH=8 y 0.7 g/L de *P. putida* CECT5279 producida en biorreactor tanque agitado, según el protocolo descrito en el apartado 2.5.3. Posteriormente, se le añadió al medio de reacción, 1 y 5 g/L de piruvato de sodio, succinato de sodio y citrato de sodio, según el ensayo realizado, como fuentes de carbono adicionales. De forma paralela y para todos los sustratos, se realizaron los correspondientes ensayos control, en los que no se añadió ninguna fuente de carbono adicional.

Todos los ensayos se realizaron en Erlenmeyers de 100 mL y con un volumen total de trabajo de 10 mL, realizándose por triplicado Las condiciones de operación

fueron de 30°C de temperatura, 250 rpm de agitación y 3 horas de tiempo de reacción, en agitador orbital.

Para cuantificar la conversión del producto inicial en cada ensayo, se ha utilizado el parámetro  $X'_{BDS}$ , el cual describe la conversión del compuesto utilizado en cada ensayo (DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub>), con la formación del producto final libre de azufre (HBP). Dicho parámetro se representa por la siguiente ecuación:

$$X'_{BDS} (\%) = \left( \frac{C_{HBP_t}}{C_{DBT_x}} \right) \cdot 100 \quad (5.2)$$

Donde  $C_{HBP_t}$  es la concentración formada de HBP al final de la reacción y  $C_{DBT_x}$  es la concentración inicial del compuesto de partida utilizado en cada ensayo, siendo DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub> en cada uno de ellos. En el caso de DBT, los valores de este parámetro van a coincidir con el rendimiento de desulfuración ( $X_{BDS}$ ) habitualmente utilizado.

Los resultados obtenidos de  $X'_{BDS}$  en los ensayos que se han utilizado diferentes sustratos y fuentes de carbono añadidas, se recogen en la figura 5.8.

En la figura 5.8 (a), pueden observarse los resultados de  $X'_{BDS}$  correspondientes a los ensayos para DBT. Puede observarse como la adición de cosustrato en pequeñas concentraciones apenas mejoran los resultados alcanzados por el ensayo control. Sin embargo, al aumentar la concentración a 5g/L de cosustrato, se observa una mejora de la conversión de DBT para todos los ensayos, de forma independiente a la fuente de carbono añadida.

Las mejores conversiones, se han obtenido en los ensayos en los que se ha añadido 5g/L de piruvato, obteniéndose un valor de  $X'_{BDS}$  de 35.89%, siendo muy similares para los ensayos en los que se añadió succinato, 31.49% y siendo muy inferiores en los ensayos en los que añadió citrato, obteniéndose un valor de 25.14%, para la misma concentración.

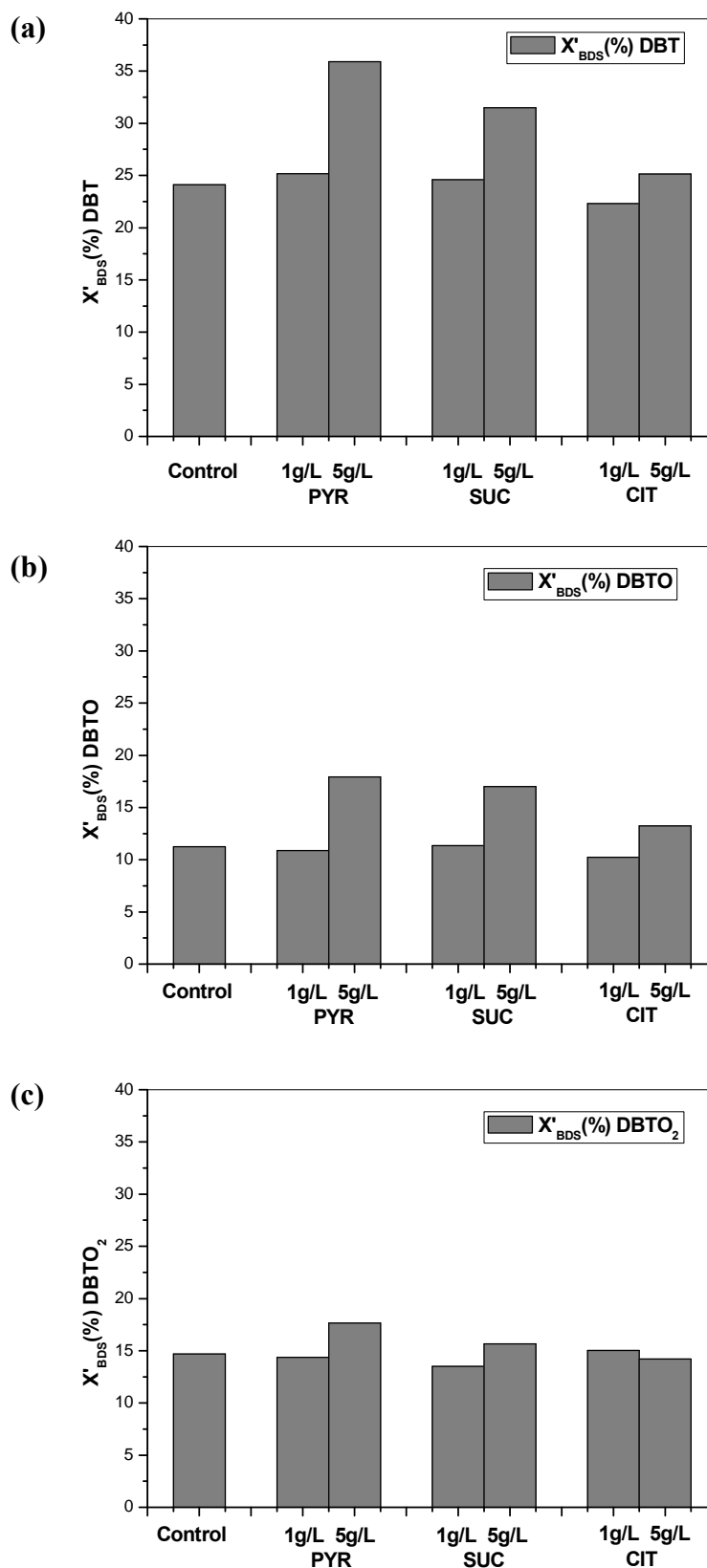


Figura 5.8. Resultados de  $X'_{BDS}$  obtenidos para DBT (a), DBTO (b) y DBTO<sub>2</sub> (c), añadiendo distintas fuentes de carbono adicionales en el proceso de BDS en *resting-cell* utilizando el biocatalizador *P.putida* CECT5279.

Por lo tanto, en los ensayos de *resting cell* acuosos en los que se ha utilizado DBT como sustrato y en los que se ha añadido piruvato a una concentración de 5 g/L, se ha observado una mejora del rendimiento de desulfuración del 32%, respecto del ensayo control.

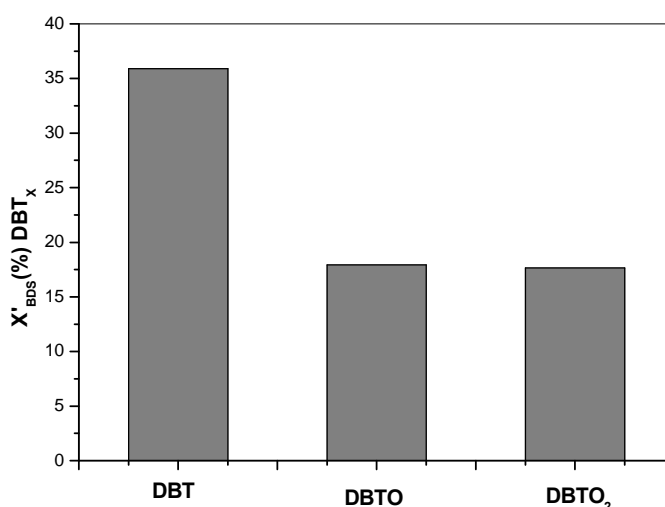
En la figura 5.8 (b) se muestran los resultados de  $X'_{BDS}$  correspondientes a los ensayos en los que se ha utilizado DBTO como sustrato y a los cuales se ha añadido piruvato, succinato y citrato en distintas concentraciones. Como en el caso de DBT, el efecto del cosustrato a baja concentración apenas mejora la conversión. En cambio, si se observa un aumento notable de  $X'_{BDS}$  para la mayor concentración de cosustrato añadida.

En cuanto a la influencia de la fuente de carbono adicional, se observa como los mejores resultados se obtienen para los ensayos donde se añadido piruvato y succinato, donde se obtienen valores de un 17.92 y 17.02% respectivamente. En el caso del ensayo en los que se añadió citrato, se obtuvieron valores de  $X'_{BDS}$  inferiores, siendo de 13.23%, siendo ligeramente superior a los valores obtenidos en el ensayo control, en el que se obtenía un valor de  $X'_{BDS}$  de 11.24%.

Este mismo efecto ha sido observado en los ensayos en los que se ha utilizado el sustrato DBTO<sub>2</sub>, sobre los que se han añadido distintas fuentes de carbono adicional, aunque el efecto ha sido menos notable. Los resultados se muestran en la figura 5.8 (c). Los mejores resultados de  $X'_{BDS}$  obtenidos corresponden, de igual modo que en los sustratos anteriores, para lo ensayos de mayor concentración de cosustrato añadida, y para el piruvato, obteniéndose un valor de  $X'_{BDS}$  de 17.64%, frente a 15.66 y 14.21% correspondientes a los ensayos en los que se ha añadido succinato y citrato respectivamente. Se ha obtenido por tanto, un incremento de  $X'_{BDS}$  del 16% en el ensayo en el que se ha utilizado como cosustrato piruvato con una concentración de 5 g/L.

Del mismo modo que en el caso anterior, se produce una mejora sustancial en el caso de añadir 5g/L de piruvato, aumentando el valor de  $X'_{BDS}$  en un 37% superior respecto del valor obtenido en el ensayo control.

Por tanto, para todos los compuestos utilizados se produce una mejora en la conversión al añadir las fuentes de carbono adicionales ensayadas, obteniéndose los mejores resultados para el piruvato y el cual se ve favorecido al aumentar la concentración de cosustrato añadida. En la figura 5.9 se muestran los resultados de  $X'_{BDS}$  obtenidos para DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub>, en condiciones de resting cell en medio acuoso, en los ensayos en los que se ha añadido 5 g/L, obteniéndose así los mejores resultados de desulfuración.



**Figura 5.9.** Resultados de  $X'_{BDS}$  obtenidos para DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub>, en los ensayos en los que se ha añadido 5 g/L de piruvato en el proceso de BDS en *resting-cell* en medio acuoso utilizando el biocatalizador *P.putida* CECT5279.

Este efecto puede explicarse, ya que el aporte de los cofactores procedentes las fuentes de carbono adicionales añadidas en el proceso de *resting cell*, pueden aumentar la actividad de las enzimas implicadas en la ruta 4S. Los intermediarios del ciclo de Krebs, pueden generar H<sup>+</sup> libres que a su vez, regeneran los cofactores NAD<sup>+</sup> implicados en la ruta 4S, reactivando la acción de la enzima HpaC, y esta a su vez, regenerando los cofactores FMN<sup>+</sup>, que aumentan la actividad de las enzimas DszC y DszA, mejorando la actividad enzimática en todas las etapas de la ruta 4S, y por lo tanto mejorando los rendimientos de desulfuración.



### **5.2.2. Estudio de la adición de cosustratos en medio bifásico**

Una vez determinado el piruvato era la fuente de carbono con la que se obtenían los mejores rendimientos de conversión para DBT y cuya su dosis óptima era de 5 g/L en condiciones de *resting cell* en fase acuosa, se ha procedido a estudiar la influencia de la adición de dicho cosustrato en condiciones bifásicas.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en Erlenmeyer de 100 mL, con un volumen de trabajo de 10 mL. El medio acuoso estaba formado por Hepes a pH=8, 10 g/L de *P. putida* CECT5279 producida en *air-lift* (según el protocolo descrito en el apartado 2.5.3), y en el cual se adicionaron concentraciones 1 y 5 g/L de piruvato, en cada ensayo. El medio orgánico estaba constituido por 108  $\mu$ M de DBT, disuelto en hexadecano, y la relación de fase acuosa-orgánica se ha mantenido en un ratio 1:1. Las condiciones de operación fueron de 30°C de temperatura, 250 rpm de agitación y 5 horas de reacción.

En la siguiente tabla se indican los porcentajes de desulfuración y las velocidades específicas de producción de HBP obtenidas para cada ensayo.

<b>Cosustrato</b>	<b>X<sub>BDS</sub> (%)</b>	<b>v<sub>0</sub>HBP(<math>\mu</math>mol/gx h)</b>
<b>Control</b>	23.62	1.18
<b>Piruvato 1 g/L</b>	20.90	1.19
<b>Piruvato 5 g/L</b>	26.26	1.21

**Tabla 5.2. Resultados de X<sub>BDS</sub> y de la velocidad específica de producción de HBP en los ensayos realizados en *resting cell* en condiciones bifásicas, con la adición de piruvato como cosustrato en distintas concentraciones.**

De los datos recogidos en la tabla 5.2 puede deducirse que la adición de piruvato en los ensayos de *resting cell* en medio bifásico no mejora el rendimiento de desulfuración, independientemente de la concentración de cosustrato suministrada. Por otro lado, las velocidades de producción de HBP son similares en todos los casos, comparadas con el ensayo control, en el cual no se adicionó cosustrato.

En medio bifásico, la adición de una segunda fuente de carbono no mejora el proceso de biodesulfuración como sucedía en los ensayos realizados en condiciones acuosas..

Por otro lado, se midió la concentración de piruvato consumida al final de la reacción por HPLC-DAD, obteniéndose unos resultados de 0.14 y 0.62 g/L para los ensayos en los que se adicionaron 1 y 5 g/L de piruvato, respectivamente. Por tanto, la mejora de las actividades enzimáticas conseguidas por la adición de piruvato, no es suficiente para compensar los efectos nocivos producidos por la presencia de la fase orgánica.

### 5.3. REUTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EN RESTING CELL

Generalmente la reutilización de microorganismos se ha limitado a su uso en aquellos procesos que implican la inmovilización de biocatalizador. En bibliografía se han encontrado diversos trabajos en los que se reutilizan microorganismos a distintas escalas, siendo las más usadas el agitador orbital y el biorreactor de lecho fluidizado.

En el caso de algas, Arabi y col., 2010, utilizaron la cepa *Nostoc muscorum* inmovilizada en alginato de sodio, para la producción de testosterona a escala de agitador orbital y los cuales llegaron a realizar hasta cinco ciclos de reutilización sin pérdida de la actividad catalítica. En el caso de levaduras, Guo y col., 2009, utilizaron la cepa *Saccharomyces ellipsaideus* GIM2, para la síntesis de  $\alpha$ -hidroxi-ácidos con interés farmacéutico, en condiciones de células libres. El biocatalizador fue reutilizado en 20 ciclos consecutivos sin perder su capacidad biocatalítica.

En biorreactor de lecho fluidizado, Varma y col., 2010, utilizaron como biocatalizador el hongo *Candida Tropicalis*, el cual era capaz de biodegradar etanol. El biocatalizador fue inmovilizado en alginato de calcio, y en el cual le hicieron pasar un medio continuamente durante cuatro meses, manteniendo el 95% de su actividad catalítica. Por otro lado, también realizaron estudios con células libres, las cuales, una vez utilizadas, eran centrifugadas y posteriormente resuspendidas en el mismo medio de reacción, de forma que mantuvieron constante la concentración de biomasa. Los resultados de conversión de las células libres eran muy inferiores respecto de los biocatalizadores inmovilizados, manteniendo una actividad celular durante tan sólo doce días.

Para la reutilización de bacterias, Chantawongvuti y col., 2010, utilizaron como biocatalizador *Lactobacillus salivarius* ATCC, para la producción a lo largo de la fermentación de ácido láctico, utilizando células inmovilizadas y libres, en agitador orbital. En este trabajo observaron, como con las células inmovilizadas se obtenía el doble de producción de ácido láctico, y como se reducía casi a la mitad el tiempo de fermentación. Tan sólo con las células inmovilizadas se realizaron ensayos de reutilización, obteniéndose resultados óptimos durante cinco ciclos, sin que la capacidad catalítica se viera afectada.

Como es bien sabido, la presencia de determinados compuestos en el medio de reacción, como hexadecano o los surfactantes, puede afectar a la viabilidad del biocatalizador *P. putida* CECT5279 en condiciones de *resting cell*. Por tanto, en primer lugar, ha sido necesario determinar el grado de toxicidad de estos medios, en condiciones acuosas y bifásicas. Posteriormente, se han realizado ensayos de reutilización del biocatalizador empleando como sustratos, DBT y los intermedios de la ruta 4S, DBTO y DBTO<sub>2</sub>. De forma paralela, se ha estudiado el efecto de la adición de piruvato sobre la conversión de estos sustratos en los distintos ciclos de reutilización.

### ***5.3.1. Estudio de la viabilidad celular en condiciones de resting cell***

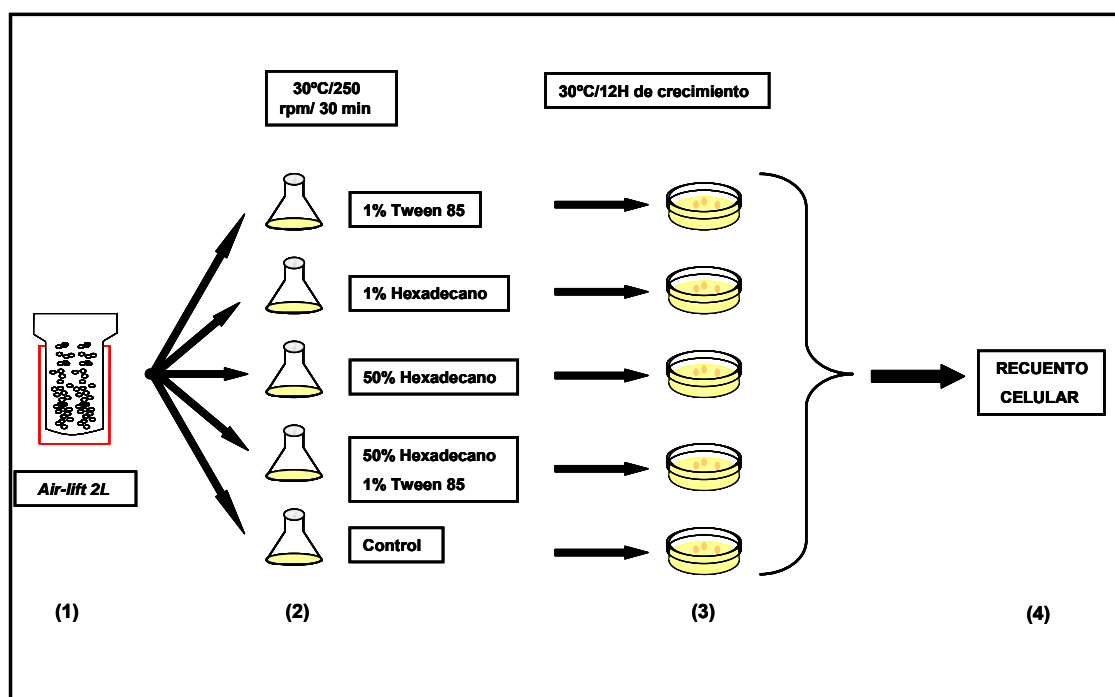
Previamente a la realización del estudio de la reutilización de las células en ensayos de *resting cell* en ciclos sucesivos, ha sido necesario determinar el grado de toxicidad de los medios habitualmente utilizados en condiciones de *resting cell* en medio acuoso y bifásico.

El biocatalizador utilizado en todos los ensayos ha sido producido en un biorreactor *air-lift* de 2L, con una edad de crecimiento de 12 horas, las cuales han sido producidas y almacenadas de la forma habitual, según se describe en el apartado 2.5. La concentración de biocatalizador utilizado en todos los ensayos fue de 0.7 g/L.

Los medios utilizados en *resting cell* en condiciones bifásicas han sido 1% (v/v) de hexadecano, 1% (v/v) de Tween 85 y una mezcla compuesta por 1% (v/v) Tween 85 y 50% (v/v) de hexadecano los medios ensayados en condiciones bifásicas, así como un ensayo control, utilizando Hepes a pH=8, en medio acuoso. El contacto del biocatalizador y el medio se realizó en Erlenmeyers de 100 mL, con un volumen total de 10 mL, a 250 rpm de agitación y 30°C de temperatura, durante 30 minutos en agitador orbital.

Posteriormente, una vez realizada la etapa de contacto entre el biocatalizador y el medio de reacción, se centrifugó el medio a 3000 rpm durante 5 minutos, y posteriormente la biomasa se resuspendió en 1mL de Hepes a pH=8, con la cual se

inoculó una placa Petri, y a la que previamente se le añadió 150  $\mu$ L de tetraciclina. Cada una de las placas se ha incubado a 30°C de temperatura durante 12 horas, las cuales, pasado este tiempo, se ha realizado la cuantificación celular por recuento en placa en superficie. El esquema de trabajo se muestra en la figura 5.10.



**Figura 5.10.** Esquema de trabajo para determinar la viabilidad celular de *P. putida* CECT5279, la cual está compuesta por cuatro etapas: (1) Crecimiento en air-lift de 2L; (2) Puesta en contacto del biocatalizador con el medio; (3) Crecimiento en placa Petri; (4) Recuento celular de placa en superficie.

Los datos recogidos en la tabla 5.3 muestran el número de colonias de *P. putida* CECT5279 contabilizadas en placa Petri tras 12 horas de crecimiento en incubadora, a las que previamente se le ha puesto en contacto con los compuestos que forman habitualmente el medio de *resting cell* en condiciones bifásicas.

Puede observarse como el efecto de Tween 85 y de hexadecano en bajas proporciones no resulta tóxico para el biocatalizador, obteniéndose prácticamente el mismo número de colonias que el ensayo control, en el cual el medio estaba compuesto por tampón Hepes pH=8. En cambio, para proporciones elevadas de hexadecano y de

la mezcla formada por hexadecano y Tween 85, al 50%, no se observó crecimiento de colonias, por lo que se deduce que su contacto a dosis elevadas provoca la muerte del biocatalizador.

Compuesto	Proporción % (v/v)	Nº colonias (12h)
Tween 85	1	237
Hexadecano	1	255
Hexadecano	50	0
Hexadecano/1%Tween 85	50	0
Control	0	250

**Tabla 5.3. Resultados de las colonias de *P. putida* CECT5279 crecidas en placa Petri, correspondientes a los ensayos de toxicidad realizados utilizando distintos tipos de compuestos y proporción.**

Estos resultados demuestran que la actividad bacteriana en los ensayos en *resting cell* en medio bifásico, se va a ver reducida por el efecto tóxico producido por el contacto con el hexadecano y Tween 85 a elevadas proporciones, limitando la capacidad de reutilización del biocatalizador en estas condiciones.

### ***5.3.2. Estudio de la reutilización de *P. putida* CECT5279 en condiciones acuosas***

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se ha descartado la reutilización del biocatalizador en condiciones bifásicas de *resting cell*, debido a elevada toxicidad de los compuestos que forman el medio de reacción en el biocatalizador. Sin embargo, se ha realizado el estudio de reutilización de *P. putida* CECT5279 en condiciones acuosas, para determinar la pérdida de actividad de las enzimas de las etapas de la ruta 4S con el número de ciclos de reutilización. Por otro lado, se ha añadido piruvato de sodio como cosustrato, para evaluar su influencia en la regeneración de cofactores en los distintos ciclos de reutilización.

El estudio de la reutilización del biocatalizador *P. putida* CECT5279 ha constado de tres ciclos de reacción para todos los sustratos utilizados. En todos los ciclos, los ensayos se han realizado en Erlenmeyers de 250 mL de volumen, y con un

volumen final de trabajo de 50 mL. El medio de reacción estaba formado por 10  $\mu$ M de DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub> disueltos en etanol y tampón Hepes pH=8.

Las condiciones de operación fueron de 30°C y 250 rpm, y el tiempo de reacción variaba en función del sustrato utilizado, siendo de 30 minutos para DBTO y DBTO<sub>2</sub> y de 60 minutos para DBT en cada etapa de reutilización.

La concentración inicial de biocatalizador añadido fue 2 g/L de *P. putida* CECT5279 de 12 horas de edad celular procedente de biorreactor *air-lift*. Para su reutilización en las sucesivas etapas, el medio fue centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. En la siguiente etapa, la biomasa se resuspendió en medio Hepes pH=8, y posteriormente se inoculó el medio fresco de reacción, para comenzar un nuevo ciclo de biodesulfuración. El esquema de trabajo seguido se muestra en la figura 5.11.

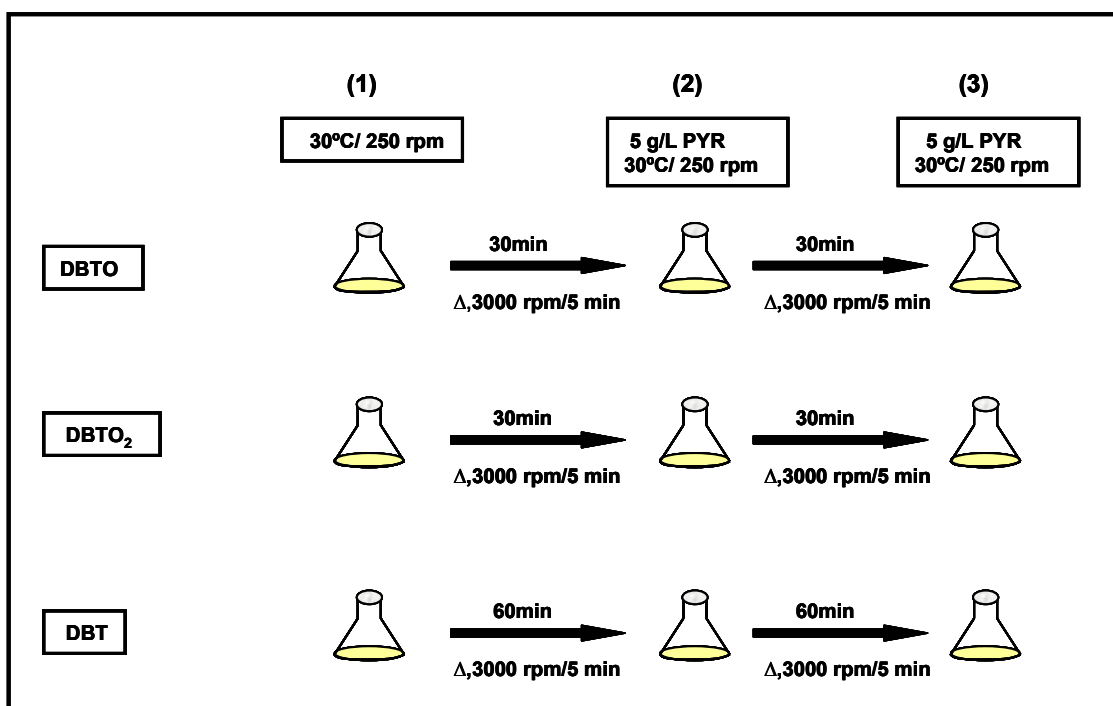


Figura 5.11. Esquema de los ciclos de reutilización celular en el que se ha utilizado como biocatalizador *P. putida* CECT5279 y como sustratos DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub>.

Por otro lado, para observar la influencia de la adición de una fuente de carbono suplementaria, se realizaron ensayos en los cuales se añadió 5 g/L de piruvato, en el segundo y tercer ciclo de biodesulfuración.

En todos los ciclos de reutilización se medía la biomasa inoculada, debido a las posibles pérdidas producidas en los procesos de centrifugación y trasvase de líquidos.

Para realizar el seguimiento de la actividad de desulfuración en todas las etapas, se han recogido muestras de 0.5 mL al principio y al final de cada ciclo de reutilización, la cual se ha diluido en acetonitrilo en proporción 1:1, para ser posteriormente analizada por HPLC, de la forma habitual en condiciones acuosas.

Para evaluar la capacidad desulfurante en cada ciclo de reutilización del biocatalizador, se ha utilizado el parámetro  $X'_{BDS}$ , descrito en el apartado anterior. Los valores de  $X'_{BDS}$  correspondientes a estos ensayos se muestran en la figura 5.12. (a), (b) y (c) para DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub> respectivamente.

Como puede observarse para DBT, en el ciclo I se obtienen los mayores rendimientos de  $X'_{BDS}$  para los dos ensayos realizados, obteniéndose valores de 58.63 y de 62.78%. En cambio en el ciclo II se observa una disminución importante del valor de  $X'_{BDS}$ , reduciéndose sustancialmente respecto del ciclo I, y los cuales van a disminuir progresivamente en el ciclo III, llegando a alcanzarse valores muy similares en ambos ensayos y siendo independiente de la adición de piruvato, produciéndose una pérdida de la capacidad desulfurante de entre el 80-85% en ambos ensayos.

En el caso de DBTO, se puede observar como del ciclo I al ciclo II el valor de  $X'_{BDS}$  disminuye de forma moderada, disminuyendo en ambos ensayos en torno a un 40% y manteniéndose prácticamente constante del ciclo II al ciclo III, tanto para los ensayos en los que se ha adicionado piruvato, como para el control.



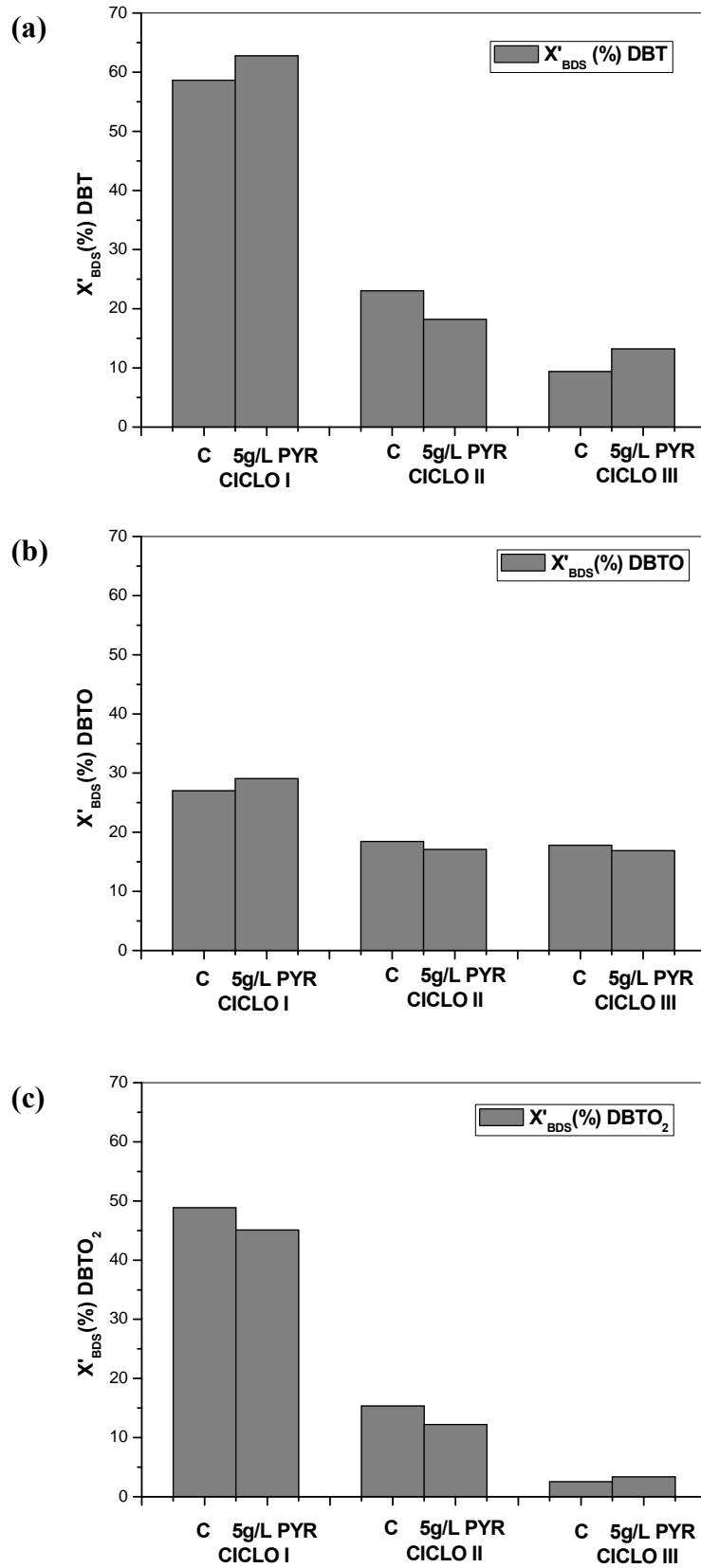


Figura 5.12. Resultados de  $X'_{BDS}$  obtenidos para los sustratos DBT (a), DBTO (b) y DBTO<sub>2</sub> (c) en las distintas etapas de reutilización de *P.putida* CECT5279, en el proceso de BDS en resting-cell en condiciones acuosas, para los ensayos control (C) y con adición de 5g/L de piruvato.

En cambio, y del mismo modo que para DBT, se observa una disminución importante del valor de  $X'_{BDS}$  para  $DBTO_2$  conforme se realizan los ciclos de reutilización. Del ciclo I al ciclo II, tanto para el ensayo control como para el ensayo en el que se ha adicionado piruvato, se observa una disminución de la capacidad desulfurante del 70%. En el último ciclo se obtienen valores de  $X'_{BDS}$  mínimos, siendo de 2.56 y 3.38% para el ensayo control y el ensayo con piruvato, respectivamente.

De forma general puede concluirse, como al realizar ciclos de reutilización, estos afectan de forma importante a todos los sustratos ensayados, siendo independiente de la adición de una fuente de carbono adicional.

Se cree que la disminución de la capacidad desulfurante estará influenciada, por las sucesivas etapas de centrifugación llevadas a cabo al pasar de una ciclo a otro, que pueden generar una situación de estrés en el biocatalizador, afectando a su actividad enzimática.

Por esta razón, se han obtenido las correspondientes velocidades específicas de producción para el compuesto final libre de azufre, HBP. Estas velocidades se han obtenido teniendo en cuenta la cantidad de HBP formada en los primeros 60 minutos de reacción, en la que la conversión de DBT era aproximadamente del 10%. Las velocidades obtenidas para cada sustrato en cada uno de los ciclos, se muestra en la tabla 5.4.

CICLO DE REUTILIZACIÓN	ENSAYO	DBT	DBTO	DBTO2
		$v_0$ HBP ( $\mu\text{mol/g}_x \cdot \text{min}$ )	$v_0$ HBP ( $\mu\text{mol/g}_x \cdot \text{min}$ )	$v_0$ HBP ( $\mu\text{mol/g}_x \cdot \text{min}$ )
I	Control	0.0521	0.104	0.104
	5 g/L Pyr	0.0577	0.124	0.115
II	Control	0.0263	0.157	0.052
	5 g/L Pyr	0.0224	0.134	0.045
III	Control	0.0191	0.147	0.048
	5 g/L Pyr	0.0215	0.133	0.052

**Tabla 5.4. Velocidades específicas de producción del compuesto HBP para cada sustrato, y ciclo de reutilización, para los ensayos control y para los ensayos en los que ha añadido 5 g/L de piruvato.**

Como puede observar en la tabla 5.4, en el caso de DBT, las velocidades específicas de producción máximas de HBP se alcanzan en el ciclo I, siendo de 0.0521 y de 0.0577  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{gx}$  para el ensayo control y el ensayo con adición de piruvato, respectivamente. En cambio estos valores disminuyen de forma importante en el ciclo II, reduciéndose en torno a 50%, manteniéndose prácticamente constantes en el ciclo III.

En el caso de DBTO, las velocidades de producción de HBP se mantienen prácticamente constantes en los distintos ciclos de reutilización, siendo además independiente de la adición de la fuente de carbono adicional. En cambio, para el DBTO<sub>2</sub>, las mayores velocidades de producción de HBP se alcanzan para el primer ciclo, siendo de 0.104 y 0.115  $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$  y reduciéndose a la mitad en el segundo ciclo de reutilización, respectivamente para el ensayo control y para el ensayo en el que se ha adicionado un cosustrato. Posteriormente, y del mismo modo que sucedía en el DBT, las velocidades de producción de HBP en el ciclo III van a ser prácticamente iguales a las obtenidas en el ciclo II.

Del mismo modo que para  $X'_{\text{BDS}}$ , las velocidades específicas de producción de HBP, se van a ver afectadas por las sucesivas etapas de reutilización, disminuyendo de forma progresiva según aumenta el número de ciclos, siendo este efecto más pronunciado tanto para DBT como para DBTO<sub>2</sub>.

#### **5.4. EFECTO DE LA EDAD DE BIOCATALIZADOR SOBRE EL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN EN CONDICIONES BIFÁSICAS**

En el apartado 3.3.2 se estudiaba la relación existente entre el tipo de biorreactor utilizado para producir *P. putida* CECT5279 y la evolución de la capacidad desulfurante con la edad de crecimiento. El ensayo utilizado para determinar la capacidad desulfurante en cada caso, se llevaba a cabo en *resting cell* en medio acuoso descrito en el apartado 2.5.4.

En este estudio se llegó a la conclusión que las células producidas en *air-lift* y posteriormente recogidas a las 12 horas de crecimiento, presentaban la máxima capacidad de desulfuración.

Este hecho era muy similar al observado por otros autores. Martin y col., 2004 y 2005, mostraban como las células producidas en un biorreactor tipo tanque agitado, con una edad de crecimiento entre 9 y 15 horas, presentaban la máxima capacidad desulfurante.

En todos los casos, los ensayos realizados para determinar la capacidad desulfurante del microorganismo producido a distintas edades, siempre se ha realizado en condiciones acuosas. En este apartado, lo que se pretende es corroborar los resultados obtenidos en esas condiciones pero trabajando en condiciones bifásicas. Se pretende estudiar la influencia de la edad de crecimiento sobre el proceso de biodesulfuración de DBT y de sus derivados alquilados en estas condiciones.

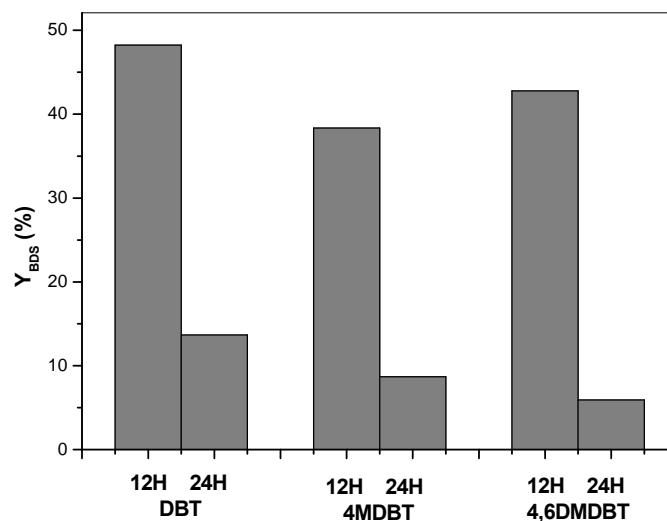
Los ensayos de biodesulfuración en medio bifásico fueron realizados por triplicado, en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de volumen total. Las condiciones de operación en todos los ensayos fueron de 30°C y 250 rpm durante 5 horas de reacción.

La fase acuosa utilizada estaba compuesta por 12 g/L de HEPES pH 8, 15 g/L de *P. putida* CECT5279 de 12 y 23 horas de crecimiento en cada ensayo respectivamente, y 1% (v/v) de Tween 85 y 0.5% (v/v) de etanol.

La fase orgánica empleada estaba compuesta por 108  $\mu$ M de DBT, 4MDBT o 4,6DMDBT, según el ensayo, disuelto previamente en hexadecano, y en el cual la relación de fase acuosa-orgánica se ha mantenido en un ratio 1:1.

Para determinar el grado de conversión en cada ensayo, se utilizó el parámetro  $Y_{BDS}$ . Por otra parte, se obtuvieron los correspondientes coeficientes de transferencia de materia para cada Cx-DBT, utilizando el método integral descrito en el apartado 4.2.2.

En la figura 5.13 se muestran los resultados de  $Y_{BDS}$  correspondientes a los ensayos realizados utilizando Cx-DBT como sustratos y biocatalizador con distintas edades de crecimiento, en condiciones de *resting cell* en medio bifásico.



**Figura 5.13.** Resultados de  $X_{BDS}$  obtenidos para los sustratos DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT utilizando como biocatalizador *P.putida* CECT5279 de 12 y 24 horas de edad, en el proceso de BDS en *resting-cell* en condiciones bifásicas.

Para todos los compuestos Cx-DBT puede observarse como todos los valores de  $Y_{BDS}$  son muy superiores en el caso de utilizar un biocatalizador de 12 horas de crecimiento frente al de 24 horas.

De todos los ensayos realizados, el compuesto DBT es el que mayor grado de conversión alcanza con un valor de 48.23%, y en el cual se obtienen valores de  $Y_{BDS}$  muy similares para 4MDBT y 4,6DMDBT, en los ensayos en los que se ha utilizado el biocatalizador de 12 horas de crecimiento.

La tendencia observada cuando se utiliza el biocatalizador de 24 horas es muy similar a la anterior, pero obteniéndose peores resultados de  $Y_{BDS}$ . En el caso de DBT, es el que presenta la mayor conversión, alcanzando un valor de  $Y_{BDS}$  de 13.68%, y

obteniéndose valores de  $Y_{BDS}$  muy inferiores para los compuestos 4MDBT y 4,6DMDBT, siendo de 8.69 y 5.92% respectivamente.

Por otro lado, se han calculado las velocidades iniciales de desaparición correspondientes a los compuestos Cx-DBTs en los ensayos realizados con biocatalizador de distinta edad.

Como puede apreciarse en la tabla 5.5, todas las velocidades correspondientes a los ensayos en los que se ha utilizado el microorganismo de 12 horas son superiores a las correspondientes a los ensayos en los que se ha utilizado un microorganismo de 24 horas.

De forma general, las velocidades iniciales obtenidas van a aumentar conforme disminuye el grado de alquilación, obteniéndose en ambos casos, el mayor valor para el compuesto DBT, siendo de  $1.91 \cdot 10^{-2}$  y  $3.60 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ , para los ensayos en los que se ha utilizado biocatalizador con una edad de crecimiento de 12 y 24 horas respectivamente.

Cx-DBT	$v_0\text{CxDBT} \cdot 10^{-2}$ ( $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ ) <i>P. putida</i> CECT5279 12 H	$v_0\text{CxDBT} \cdot 10^{-2}$ ( $\mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ ) <i>P. putida</i> CECT5279 24 H
DBT	1.91	0.36
4MDBT	1.64	0.29
4,6DMDBT	1.04	0.21

**Tabla 5.5. Velocidades iniciales de conversión de Cx-DBT correspondiente a los ensayos en *resting cell* en medio bifásico con *P. putida* CECT5279 de 12 y 24 horas de crecimiento.**

Para completar el estudio, se obtuvieron las correspondientes constantes cinéticas aparentes ( $K_{\text{Cx-DBT}}$ ) para cada uno de los compuestos Cx-DBT, obtenidos utilizando el método cinético descrito en el apartado 4.2.2, los cuales se recogen en la siguiente tabla:

Cx-DBT	K (min <sup>-1</sup> ) · 10 <sup>4</sup> <i>P. putida</i> 12h	K(min <sup>-1</sup> )·10 <sup>4</sup> <i>P. putida</i> 24h
DBT	26.5	14.0
4MDBT	2.07	2.37
4,6DMDBT	1.24	1.03

**Tabla 5.6.** Coeficiente de transferencia de materia para los compuestos Cx-DBT correspondiente a los ensayos en *resting cell* en medio bifásico con *P. putida* CECT5279 de 12 y 24 horas de crecimiento.

Como puede observarse en la tabla 5.6, los valores de  $K_{Cx-DBT}$  para cada compuesto, van a ser muy distintos en los ensayos en los que se ha utilizado biocatalizadores de distinta edad. En el caso de DBT se van a obtener los mayores valores de  $K_{DBT}$ , siendo de  $2.65 \cdot 10^{-3}$  y de  $1.40 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  para *P. putida* CECT5279 de 12 y 24 horas respectivamente. En el caso de los derivados alquilados, los valores de  $K_{CxDBT}$  tanto para 4MDBT, como para 4,6DMDBT, fueron de  $2.07 \cdot 10^{-4}$  y de  $2.37 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , para los ensayos con biocatalizador de 12 horas y de  $1.24 \cdot 10^{-4}$  y de  $1.03 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  para los ensayos en los que se ha utilizado el biocatalizador de 24 horas, respectivamente., por lo que en los derivados alquilados la edad del microorganismo parece no ser muy significativa en las reacciones en medio bifásico.

Estos resultados muestran que el proceso de biodesulfuración puede estar afectado por el efecto tóxico producido por el contacto de hexadecano con el microorganismo, el cual reducirá su viabilidad, y por tanto limitará la capacidad de degradación de DBT. En el apartado 5.3.1, se realizaron ensayos de viabilidad celular, poniendo en contacto el microorganismo con el medio de reacción utilizado, formado por 50% (v/v) de hexadecano y 1% (v/v) Tween 85, comprobándose que la proporción de fase orgánica utilizada habitualmente en condiciones de *resting cell* en medio bifásico, resultaba muy perjudicial para el microorganismo.

### **5.5. DESULFURACIÓN DE DBT EN RESTING CELL EN TANQUE AGITADO EN CONDICIONES BIFÁSICAS: EFECTO DEL OXÍGENO**

Como se ha comentado anteriormente en el apartado 4.3, la mayoría de trabajos que estudian el proceso de biodesulfuración de DBT utilizando distintos tipos de biocatalizadores, se han realizado a escala de agitador orbital. En cambio, los diferentes trabajos en los cuales trabajan a escala de tanque agitado, no han profundizado en el efecto del aporte de oxígeno a lo largo del proceso de BDS.

Los distintos autores se han limitado a mantener unas condiciones de aireación suficientes para el mantenimiento del microorganismo en el proceso de BDS, trabajando en un intervalo de caudales de aire entre 0.4-1 L/min para *Rhodococcus erythropolis* sp. (Folsom y col., 1999; Kobayashi y col., 2001).

En este apartado se pretende estudiar el efecto del suministro de aire a lo largo del proceso de BDS en resting cell en condiciones bifásicas, utilizando como biocatalizador *P. putida* CECT5279 en tanque agitado.

Antes de realizar el estudio de la influencia del caudal de aire sobre el proceso de BDS, ha sido necesario caracterizar el consumo de oxígeno de *P. putida* CECT5279 en los procesos de mantenimiento y desulfuración en las condiciones de trabajo.

#### **5.5.1. Caracterización del consumo de oxígeno de *P. putida* CECT5279 en resting cell en condiciones bifásicas**

Para caracterizar el aporte de oxígeno que se debe suministrar en los ensayos de BDS, es necesario conocer el consumo de oxígeno que va a corresponder tanto al mantenimiento como al proceso de desulfuración.

A partir de la ecuación 5.3, la cual define la velocidad total de consumo de oxígeno en las transformaciones microbianas, se diferencian tres términos que corresponden al consumo de oxígeno en el mantenimiento de la viabilidad celular



(representado por el coeficiente de mantenimiento  $m_{O_2}$ ), el crecimiento (considerando un rendimiento macroscópico,  $Y_{OX}$ ), y para el proceso de desulfuración ( $Y_{OP}$ ):

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_X = m_{O_2} C_X + Y_{OX} \frac{dC_X}{dt} + Y_{OP} \frac{dC_P}{dt} \quad (5.3)$$

Al trabajar en condiciones de *resting cell*, no existe crecimiento, por lo que término correspondiente se anula, quedando definida la velocidad de consumo de oxígeno por la ecuación 5.4.

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_X = m_{O_2} C_X + Y_{OP} \frac{dC_P}{dt} \quad (5.4)$$

Para determinar la velocidad de consumo de oxígeno correspondiente al mantenimiento de *P. putida* CECT5279 en el proceso de BDS en *resting cell* en condiciones bifásicas, ha sido necesario realizar un ensayo donde no se produzca reacción de BDS. La fase acuosa estaba formada por 15 g/L de *P. putida* CECT5279, producida en tanque agitado de 15L, según el protocolo descrito en el apartado 2.5 y Hepes pH=8 y 1% (v/v) de Tween 85 y 0.5% (v/v) de etanol. La fase orgánica estaba formada por hexadecano en proporción 1.1, pero en el cual no se añadió DBT. Al no añadirse sustrato, no se dará el proceso de biodesulfuración, y todo el consumo de oxígeno será debido exclusivamente al mantenimiento del biocatalizador.

Las condiciones de trabajo fueron de 250 rpm de agitación, 30°C de temperatura y una velocidad de aireación de 1L/L min, con un volumen total de trabajo de 0.5L, y un tiempo de reacción de 25 horas.

Posteriormente, con el objetivo de obtener la velocidad específica de consumo de oxígeno total, correspondiente al proceso de mantenimiento y biodesulfuración juntos, se realizó un ensayo en las mismas condiciones que en el realizado para la determinación de la velocidad específica de oxígeno correspondiente al mantenimiento, pero en el que se añadieron 272  $\mu$ M de DBT, y en la cual no se suministró aire.

Para realizar la obtención de  $q_{O_2}$  en ausencia de biodesulfuración, se tomaron los valores de oxígeno correspondientes a las primeras dos horas de reacción, correspondiente a la zona en la cual se produce una caída rápida de los valores de oxígeno. Posteriormente, se utilizó la ecuación 3.13 en su forma integrada, obteniéndose

la velocidad específica de consumo de oxígeno correspondiente al mantenimiento como la pendiente al realizar la regresión lineal.

Para la obtención de la velocidad específica de oxígeno global, correspondiente al mantenimiento y a la reacción de biodesulfuración, se utilizó la ecuación 3.13 del mismo modo que para el ensayo de mantenimiento, tomando los valores de oxígeno en las dos primeras horas, obteniéndose la velocidad específica de consumo de oxígeno global, como la pendiente al realizar el ajuste lineal.

De este modo, aplicando los valores obtenidos de ambos ensayos en la ecuación 5.4, puede obtenerse por diferencia el valor de la velocidad específica de oxígeno, correspondiente al proceso de biodesulfuración.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en la siguiente tabla:

<b>qO<sub>2</sub></b>	<b>μmol O<sub>2</sub>/gx· h</b>
<b>Mantenimiento</b>	41.0
<b>Desulfuración</b>	29.0

**Tabla 5.7 Velocidades específicas de consumo de oxígeno correspondientes al mantenimiento y al proceso de desulfuración para el biocatalizador *P.putida* CECT5279 en condiciones de *resting cell* en medio orgánico.**

Como puede observarse en la tabla 5.7, la velocidad específica de consumo de oxígeno del proceso de mantenimiento es mayor que la del proceso de desulfuración, obteniéndose unos valores de qO<sub>2</sub> de 41.0 y 29.0 μmol O<sub>2</sub>/gx·h respectivamente.

Por tanto, las cantidades de oxígeno consumido por el microorganismo son muy bajas, por lo que puede asumirse que el oxígeno disuelto en el medio se encuentra siempre en exceso, de modo que las necesidades de consumo de oxígeno del microorganismo siempre estarán cubiertas. La evolución del oxígeno disuelto a lo largo de ambos ensayos se recoge en la figura 5.14, en la cual puede observarse una evolución muy similar.

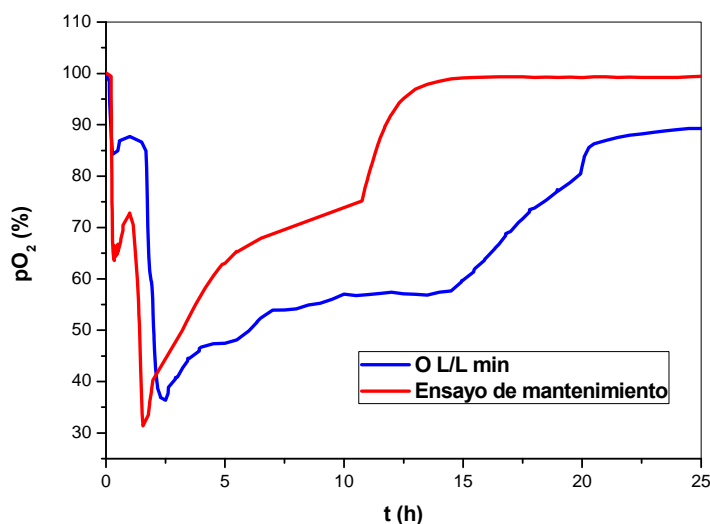


Figura 5.14. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto obtenidos en los ensayos para determinar el valor de  $qO_2$  correspondientes al mantenimiento y al proceso de desulfuración, en condiciones de *resting cell* bifásicas en tanque agitado de 2L para *P. putida* CECT5279.

En la primera fase del ensayo se produce un consumo rápido de oxígeno, alcanzando valores mínimos en torno al 30-40%, el cual posteriormente va aumentando hasta estabilizarse en torno a las 15-20 horas. Puede apreciarse como el consumo de oxígeno es mayor en el ensayo en que se produce el proceso de biodesulfuración.

Por otro lado, ha sido necesario caracterizar el transporte de oxígeno en tanque agitado, para ello se llevó a cabo la determinación de los coeficientes de transferencia de materia para el oxígeno por el método dinámico, descrito en el apartado 3.2. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Medios	$K_L a$ (min <sup>-1</sup> )
HEPES pH=8	0.315
Medio bifásico	0.155
Medio bifásico con 15 g/L <i>P.putida</i>	0.215

Tabla 5.8. Valores de los coeficientes de transferencia de oxígeno obtenidos por el método dinámico para los medios de reacción utilizados en los procesos de BDS en *resting cell* en medio acuoso y bifásico.

Como puede observarse en la tabla 5.8, los mayores valores de  $K_{La}$  se han obtenido para el ensayo en el cual el medio de reacción estaba constituido por Hepes pH=8, obteniéndose un valor de  $0.315 \text{ min}^{-1}$ . Los valores de  $K_{La}$  obtenidos para el medio formado por la mezcla de Hepes y hexadecano al 50% (v/v) son inferiores a la del medio formado solo por Hepes, obteniéndose un  $K_{La}$  de  $0.155 \text{ min}^{-1}$ . Por lo tanto, la presencia de hexadecano como fase orgánica empeora la transferencia de oxígeno a través del medio (Boltes y col., 2008), a pesar de que la formación de la emulsión, se ve favorecida por la adición de 1%(v/v) Tween 85 y 0.5%(v/v) de etanol.

En el ensayo realizado en condiciones bifásicas, en el cual se añadió biocatalizador, se obtienen de  $K_{La}$  mayores que en ensayo en el que no se añadió microorganismo, lo cual estará causado por el consumo de oxígeno del mismo, por lo que la presencia del microorganismo favorece el transporte de oxígeno.

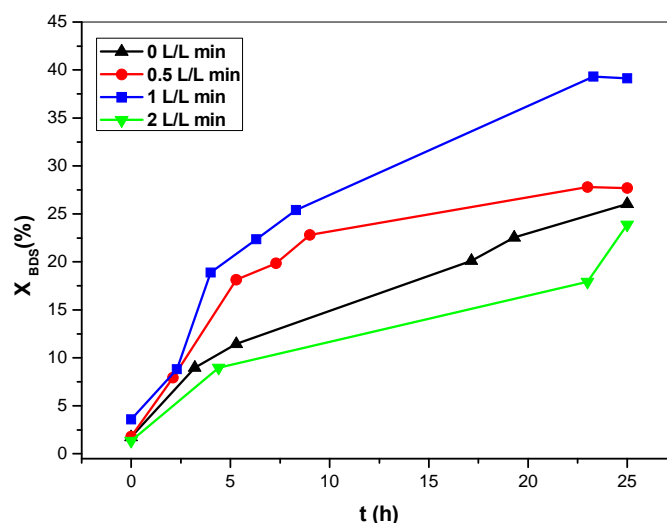
#### ***5.5.2. Efecto del suministro de aire en el proceso de biodesulfuración en resting cell en condiciones bifásicas en tanque agitado***

Los ensayos se llevaron a cabo en tanque agitado de 2L de volumen, en los que se utilizaron unas condiciones de trabajo de 30°C de temperatura, 250 rpm de agitación, y un volumen total de reacción de 0.5L y 25 horas de reacción. Se utilizó un caudal de aire entre 0 y 2 L/L min. La fase acuosa estaba formada por 15 g/L de *P.putida* CECT5279, producida en tanque agitado de 15L según se describe en el apartado 2.5, Hepes a pH=8, 0.5% (v/v) de etanol y 1% (v/v) de Tween 85. La fase orgánica estaba compuesta por 272  $\mu\text{M}$  de DBT disuelto en hexadecano, con una relación de fase acuosa-orgánica 1:1.

Para comparar la influencia del caudal de aire en los distintos ensayos realizados se ha utilizado el parámetro habitual de rendimiento de desulfuración,  $X_{BDS}$ . Por otra parte se han obtenidos las correspondientes velocidades específicas de de producción de HBP en el proceso de biodesulfuración.

En la figura 5.15 se muestra la evolución de los valores de  $X_{BDS}$  obtenidos para los ensayos realizados en condiciones de *resting cell* en medio bifásico, en el que se ha modificado el caudal de aire entre 0 y 2 L/L min. Como puede observarse, al incrementar el flujo de aire entre 0 y 1 L/L min, se produce un aumento del rendimiento de desulfuración, obteniéndose el valor máximo de  $X_{BDS}$  de 39.14% para el caudal de 1 L/L min. Sin embargo, en el caso del ensayo en el cual se ha suministrado un caudal de aire de 2 L/L min, se observa una disminución notable del rendimiento de desulfuración, obteniéndose un valor de 21.86%.

Al utilizar caudales de aireación bajos y a pesar de asumir que el oxígeno siempre se encuentra en exceso, este siempre va a cubrir las necesidades del biocatalizador para realizar las funciones de mantenimiento y de biodesulfuración, se obtienen peores rendimientos de biodesulfuración que en el caso del ensayo donde se utilizaba un caudal de aire 1 L/L min. Este efecto podría estar debido a que una mayor cantidad de aire suministrado mejorará la formación de la mezcla, favoreciendo el proceso de transporte de DBT desde la fase orgánica al interior celular, en la fase acuosa.



**Figura 5.15.** Evolución del valor de  $X_{BDS}$  en los ensayos que los que se han utilizado caudales de aire entre 0 y 2 L/L min.

Por otro lado, en los ensayos en los que se utilizan caudales de aire elevados y a pesar de que se mejora la formación de la mezcla de las fases, no se alcanzan valores

de  $X_{BDS}$  superiores, si no que se obtienen valores similares a los obtenidos a caudales bajos.

Según Gómez y col., 2006, este comportamiento podría explicarse porque una elevada concentración de oxígeno disuelto en el medio, puede disminuir la estabilidad de las enzimas implicadas en la ruta 4S, y de ese modo producir una pérdida de la capacidad de desulfuración.

Por otra parte, se han obtenido las correspondientes velocidades específicas de producción del compuesto libre de azufre final, HBP. Los resultados obtenidos para estas velocidades se muestran en la tabla 5.9.

Q aire (L/L min)	$v_0$ HBP( $\mu\text{mol/gx min}$ ) $\cdot 10^{-3}$	$X_{BDS}$ (%) 25h
0	3.08	26.05
0.5	3.12	27.70
1	4.64	39.14
2	2.53	23.87

**Tabla 5.9. Valores de la velocidades específicas de producción de HBP y el rendimiento de desulfuración obtenidos para los ensayos de biodesulfuración en resting cell en medio bifásico en tanque agitado, utilizando caudales de aireación comprendidos entre 0 y 2L/L min..**

De los datos recogidos en la tabla anterior, puede deducirse que al aumentar el caudal de aireación en el proceso de *resting cell*, aumenta la velocidad específica de producción de HBP, obteniéndose el valor máximo de  $4.64 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ , para el ensayo en el que se utilizó un caudal de aire de 1L/L min. Sin embargo, la menor velocidad específica de producción de HBP se alcanza para el caudal de 2L/L min, obteniéndose un valor de  $2.53 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ , por lo que queda comprobado que un exceso de aireación perjudica la producción de HBP, y por tanto el proceso de biodesulfuración.

En resumen, puede concluirse que el oxígeno no limita la reacción de biodesulfuración, debido a que los requerimientos de oxígeno son muy bajos tanto para el mantenimiento bacteriano como para el proceso de biodesulfuración, a pesar de que

la presencia de la elevada concentración de microorganismo, junto con el glicerol y fase orgánica, empeora el transporte de oxígeno.

Por otra parte, de todos los caudales ensayados en condiciones de *resting cell* en medio bifásico realizados en tanque agitado, los mejores resultados de  $X_{BDS}$  se han obtenido en el ensayo en el que se utilizaba un caudal de 1L/L min, y este será el caudal de aireación que ha sido utilizado en todos los ensayos de *resting cell* en medio bifásico en tanque agitado realizados en el apartado 4.3.

## **CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**

<b>6.1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE <i>P. PUTIDA</i> CECT5279 Y SU ESCALADO .....</b>	<b>261</b>
<b>6.2. BIODÉSULFURACIÓN DE Cx-DBT .....</b>	<b>262</b>
<b>6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RESTING CELL .....</b>	<b>266</b>



## 6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas tras realizar el trabajo, son las siguientes:

### 6.1. Estudio de la producción de *P. putida* CECT5279 y su escalado

1) En biorreactores tipo *air-lift*, el crecimiento del biocatalizador *P. putida* CECT5279 está claramente influenciado por las condiciones de aireación. De modo, que tanto un caudal de aireación bajo, como uno excesivamente elevado, afectan al crecimiento del biocatalizador, reduciendo la velocidad específica máxima y la concentración final de biomasa producida. El caudal de aire de 4L/min utilizado para el crecimiento del biocatalizador, ha permitido obtener los mejores resultados de  $\mu_{\max}$  y  $C_X^{\max}$ , así como obtener la mayor capacidad desulfurante.

2) El crecimiento del biocatalizador *P. putida* CECT5279 realizado en biorreactor *air-lift*, produce mayores cantidades de biomasa, obteniendo una mayor capacidad desulfurante que el biocatalizador producido en tanque agitado, siguiendo el protocolo propuesto por Martin y col., 2006. En cambio, se obtienen menores velocidades específicas máximas, por lo que el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria es mayor.

3) La capacidad desulfurante del biocatalizador varía con el tiempo de crecimiento, independientemente del tipo de biorreactor utilizado (*air-lift* o tanque agitado), de forma que la máxima capacidad de desulfuración observada se obtiene para las células de 12 horas de crecimiento, en la cual la actividad enzimática global es máxima, para la degradación de DBT.

4) En el biorreactor *air-lift*, la velocidad de consumo de oxígeno del biocatalizador está influenciado por la edad de crecimiento del microorganismo. El oxígeno consumido es empleado para desarrollar las funciones de crecimiento y de mantenimiento. Por otro lado, el coeficiente volumétrico de oxígeno está también influenciado por la presencia del biocatalizador, de modo que ha sido necesario utilizar un factor de aumento (E) que tenga en cuenta este efecto. Mediante el modelo teórico descrito y utilizado en este trabajo, ha sido posible calcular los parámetros  $k_{La}$  y E,

observándose como apenas existe variación del valor E con la concentración de biomasa.

5) Se ha realizado de forma satisfactoria el escalado del proceso de producción del biocatalizador *P. putida* CECT5279 de un biorreactor tanque agitado de 2L a uno de 15L. Para ello, se ha utilizado el *método de la regla general*, el cual se basa en el mantenimiento del valor del coeficiente de transferencia de oxígeno al realizar el cambio de escala. Por tanto, previamente ha sido necesario llevar a cabo un estudio de las condiciones hidrodinámicas el biorreactor utilizado para realizar el escalado, estudiándose la influencia de la agitación y de la aireación, para determinar el valor de  $k_{La}$ , y de ese modo ajustarlo a las condiciones utilizadas en el biorreactor de menor escala.

Al realizar el cambio de escala, se produce un incremento de la velocidad específica máxima de crecimiento, manteniéndose inalterada la capacidad desulfurante, pero sin embargo, se obtiene una menor cantidad de biomasa al final del crecimiento.

### **6.2. Biodesulfuración de Cx-DBT**

#### **i) Estudio cinético de biodesulfuración de DBT**

6) La cinética del proceso de desulfuración de DBT en fase acuosa en *resting cell* ha sido descrita por la ecuación de Michaelis-Menten. Para la obtención de los parámetros cinéticos de la degradación de DBT, se utilizaron distintos métodos gráficos, pero se determinó que el que mejor reproducía los valores experimentales era el método de Langmuir, por lo que fue posteriormente utilizado para describir la cinética de los compuestos Cx-DBT en medio acuoso.

En cambio, el proceso de biodesulfuración de DBT en un sistema bifásico, no se ha podido describir por esta ecuación, debido a los problemas de transporte y a la adición de surfactantes en el medio, por lo que se han obtenido las correspondientes constantes cinéticas aparentes ( $K_{DBT}$ ), aplicando el método integral.

7) El estudio cinético del proceso de biodesulfuración de DBT en fase acuosa a escala de agitador orbital, no ha podido ser descrito para todas las concentraciones de biomasa ensayadas. A elevadas concentraciones de biomasa, no se puede describir el proceso cinético de biodesulfuración de DBT, ya que se produce una alteración de las propiedades físicas del medio de reacción, provocada por el incremento de la proporción de glicerol presente en el medio de conservación del biocatalizador. En cambio, si se ha podido comprobar la evolución de la capacidad desulfurante, obteniéndose rendimientos de desulfuración mayores y en menor tiempo de reacción, al utilizar mayores concentraciones de biomasa, alcanzándose la conversión total de DBT.

8) Los valores de  $v_{\max}$  y  $K_m$  que describen la cinética de biodesulfuración de DBT y de los correspondientes intermedios de la ruta 4S, varían con el cambio de escala, de agitador orbital a la de tanque agitado. En el caso de DBT, los parámetros cinéticos fueron obtenidos utilizando el método de Langmuir, observándose como a escala de tanque agitado, la velocidad específica máxima era de seis veces superior al valor obtenido en agitador orbital, siendo la reacción de degradación mucho más rápida.

En cambio, para describir la cinética de los intermedios de la ruta 4S, los valores fueron tomados del trabajo de Alcon y col., 2006, necesitándose tomar valores de  $v_{\max}$  y  $K_m$  de distintas edades de crecimiento para cada una de las escalas. Por otra parte, los valores de rendimiento de desulfuración alcanzados son muchos mayores a escala de tanque agitado que en agitador orbital, alcanzándose la conversión total de DBT..

9) La reacción de desulfuración de DBT a escala de tanque agitado en condiciones bifásicas está mucho más favorecida que a escala de agitador orbital. Los rendimientos de desulfuración obtenidos son mayores, pero en cambio, las constantes cinéticas para DBT y 2HBP son muy similares en ambas escalas. Por tanto, a pesar de mejorar el proceso de transporte de DBT por el uso de agitación mecánica, este efecto se contrarresta con el estrés hidrodinámico que sufren las células, limitando la vida del biocatalizador, y por tanto de su actividad enzimática.

### **ii) Estudio cinético de biodesulfuración de Cx-DBT**

10) En el proceso de desulfuración de los compuestos Cx-DBT en medio acuoso, tanto en agitador orbital como en tanque agitado, se ha observado como las velocidades máximas de degradación disminuyen al aumentar el grado de alquilación de los sustituyentes presentes en el anillo aromático, debido a que al aumentar el número y tamaño de los sustituyentes, aumenta la hidrofobicidad de los compuestos, empeorando el proceso de transporte del compuesto Cx-DBT al interior celular.

Las velocidades máximas de degradación obtenidas en tanque agitado, son muy superiores a las obtenidas en agitador orbital. Asimismo, los rendimientos de conversión obtenidos para cada uno de los compuestos Cx-DBT son muy superiores a los obtenidos a escala de agitador orbital, obteniéndose la conversión total para los compuestos con menor grado de alquilación. El proceso de biodesulfuración se ve claramente favorecido a escala de tanque agitado. Se cree que el continuo aporte de oxígeno al microorganismo durante toda la reacción, así como el sistema de agitación mecánica, mejora la transferencia del sustrato al interior celular, y con ello la biodisponibilidad de los compuestos Cx-DBT, mejorándose los rendimientos de desulfuración.

11) Al realizarse mezclas de compuestos Cx-DBT con distinto grado de alquilación, tanto en agitador orbital como en tanque agitado, se observa un comportamiento similar en todos ellos. Las velocidades específicas máximas son mayores en los compuestos con menor grado de alquilación, pero inferiores a las correspondientes a los ensayos individuales. En cambio, los rendimientos de desulfuración varían según la escala de trabajo. En agitador orbital, la presencia de mezclas de compuestos Cx-DBT disminuye el rendimiento de conversión de los compuestos Cx-DBT, en cambio, en tanque agitado se obtiene la conversión total de todos ellos al final de la reacción, por lo que se observa como el proceso está mucho más favorecido en tanque agitado.

Por otra parte, tanto a escala de agitador orbital como en tanque agitado, el modelo se ajusta a una inhibición de sustrato no competitivo.

12) Al realizar la descripción cinética del proceso de biodesulfuración de los compuestos Cx-DBT en un sistema bifásico en *resting cell*, se ha llegado a la misma conclusión que en el caso de los ensayos realizados en fase acuosa. De modo, que para los compuestos ensayados de forma individual, se obtienen mayores valores de  $K_{Cx,DBT}$  para los compuestos con menor grado de alquilación de los sustituyentes. Esto será debido a los problemas de transferencia existentes, los cuales se agravan al aumentar la hidrofobicidad del compuesto Cx-DBT. Por otra parte, los efectos estéricos y en menor medida la posición de los sustituyentes en el anillo aromático (posiciones 4 y 6) afectan a la selectividad de la reacción, dificultando el reconocimiento específico del biocatalizador y disminuyendo así la conversión.

13) Se ha podido comprobar como al realizar mezclas de compuestos Cx-DBT en condiciones bifásicas en agitador orbital y tanque agitado, las constantes cinéticas aparentes disminuyen respecto de las obtenidas en los ensayos individuales. Asimismo, los rendimientos de conversión también disminuyen en la mezcla respecto de los ensayos individuales en ambas escalas de trabajo. Por lo tanto, el proceso de biodesulfuración se ve afectado por la presencia de compuestos Cx-DBT de distinta alquilación en el medio de reacción, obteniéndose menores rendimientos de conversión para cada uno de los derivados alquilados ensayados.

14) Se llevó a cabo la biodesulfuración de una muestra real de hidrodesulfurado, de modo que, previamente fue necesario realizar un análisis de la composición por HPLC-DAD, determinándose así los compuestos más abundantes: DBT (46.03%), 4MDBT (26.31%) y 4,6DMDBT (18.17%), y de los cuales se realizó el correspondiente estudio cinético, puesto que los parámetros obtenidos para la mezcla modelo no son válidos. Los valores de  $K_{Cx,DBT}$  varían según el grado de alquilación, obteniéndose mayores valores según disminuye el grado de alquilación. De igual forma sucede con el rendimiento de conversión, obteniéndose el mayor valor de  $Y_{BDS}$  para DBT.

### **6.3. Optimización de las condiciones de resting cell**

#### **i) Efecto de la adición de surfactantes sobre el proceso de biodesulfuración**

15) La adición de determinados surfactantes y codisolventes en el medio de reacción en condiciones bifásicas mejora en distinto grado el rendimiento de desulfuración de DBT, con el uso de *P. putida* CECT5279 como biocatalizador, ya que permiten mejorar los problemas de transferencia de DBT desde la fase orgánica hasta el interior celular.

Algunos surfactantes, como SDS y Tritón X-100, son muy tóxicos para el biocatalizador, llegando incluso a lisar la célula. En cambio, otros como Tween 85 y Tween 20, mejoran de forma notable el valor de  $X_{BDS}$  en distinta medida, obteniéndose mejores resultados para Tween 85. Por otro lado, la adición de etanol como codisolvente, también mejora de forma importante los rendimientos de desulfuración. Sin embargo, los mayores rendimientos de desulfuración se han obtenido con la adición conjunta de Tween 85 y etanol, en las proporciones de 1 y 0.5 % (v/v) respectivamente.

16) La adición de Tween 85 de forma individual y mezclado con etanol, producen una disminución de la tensión superficial del medio de reacción. La constante cinética aparente y los rendimientos de conversión obtenidos en el ensayo en el que se adicionó Tween 85 y etanol, son superiores respecto del ensayo control, de modo que estabiliza la emulsión y mejora la transferencia de DBT desde la fase orgánica a la fase acuosa, aumentando la biodisponibilidad, y favoreciendo el proceso de biodesulfuración.

#### **ii) Efecto de la adición de una fuente de carbono adicional y reutilización.**

17) La adición de una fuente de carbono adicional a elevadas concentraciones (piruvato, succinato y citrato de sodio) en el proceso de biodesulfuración de DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub> en condiciones acuosas, mejoran los rendimientos de desulfuración respecto del ensayo control.

Sin embargo, dependiendo de la fuente de carbono adicionada, el proceso se mejora en distinto grado, siendo el piruvato la fuente de carbono que incrementa de

forma importante el rendimiento final de desulfuración obtenido, y siendo más destacado en el caso de DBT.

El efecto de la adición de piruvato en condiciones bifásicas, no mejora el proceso de biodesulfuración, debido a que el efecto nocivo producido por la fase orgánica sobre el biocatalizador es mayor que la mejora producida por la adición de piruvato.

18) El efecto tóxico de los compuestos que forman parte del medio de reacción, como hexadecano y Tween 85 a elevadas concentraciones en condiciones bifásicas de *resting cell*, son determinantes para la viabilidad celular, limitando la actividad bacteriana, por lo que va a imposibilitar su reutilización en estas condiciones.

19) De forma general puede concluirse que al realizar tres ciclos de reutilización del biocatalizador *P. putida* CECT5279 para la desulfuración de DBT, DBTO y DBTO<sub>2</sub>, en condiciones acuosas de *resting cell*, se produce una pérdida de la capacidad desulfurante, debido principalmente a la situación de estrés a la que es sometido el microorganismo en los ciclos de centrifugación, y a la pérdida de biomasa debida a los sucesivos trasvases realizados. De forma, que en la adición de pulsos de piruvato, como fuente de carbono adicional, entre las etapas de reutilización, no se observa mejora en los rendimientos de desulfuración en ninguna de las etapas, para ninguno de los sustratos utilizados, por lo que primará en todos los casos la pérdida de capacidad desulfurante por las razones anteriormente comentadas.

### **iii) Efecto de la edad del biocatalizador sobre el proceso de biodesulfuración en condiciones bifásicas**

20) Como se ha observado en las producciones del biocatalizador en los distintos biorreactores (tanque agitado y *air-lift*), la actividad desulfurante en condiciones acuosas depende de la edad celular del biocatalizador. En los sistemas bifásicos, se va a producir un comportamiento similar, de forma que el rendimiento de conversión de DBT, 4MDBT y 4,6DMDBT es mayor en los ensayos que se ha utilizado un biocatalizador de 12 horas de crecimiento, frente al obtenido para un biocatalizador de 24 horas.

21) Realizado el estudio cinético de la biodesulfuración de Cx-DBT utilizando biocatalizadores de distinta edad de crecimiento, en condiciones bifásicas, puede concluirse que las constantes cinéticas aparentes, así como las correspondientes velocidades iniciales específicas, son muy superiores en el caso de utilizar un biocatalizador con una edad de crecimiento de 12 horas, independientemente del compuesto Cx-DBT utilizado. Por lo tanto, la actividad de desulfuración del biocatalizador de 12 horas es muy superior a la que posee el biocatalizador de 24 horas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en condiciones acuosas.

### **iv) Desulfuración de DBT en *resting cell* en condiciones bifásicas en tanque agitado: efecto del oxígeno**

22) Puede concluirse que el oxígeno no limita la reacción de biodesulfuración en condiciones bifásicas en tanque agitado, debido a que los requerimientos de oxígeno son muy bajos para el proceso de biodesulfuración en *resting cell*.

23) El suministro de oxígeno durante el proceso de biodesulfuración de DBT es una variable importante que es necesario controlar. De modo, que un aporte excesivo provoca un estrés oxidativo en el microorganismo produciendo una pérdida de la estabilidad de la maquinaria enzimática, disminuyendo así el rendimiento de desulfuración, y la velocidad específica inicial de degradación de DBT.

Los mejores rendimientos de desulfuración de DBT en condiciones bifásicas de *resting cell*, utilizando tanque agitado, se obtienen para un caudal de aireación de 1L/L·min, de forma que un aporte adecuado de aire, favorece la formación de la mezcla de fases, aumentando el transporte de DBT desde la fase orgánica hasta el interior celular.



**CAPÍTULO 7. NOMENCLATURA ..... 271**

## 7. NOMENCLATURA

4MDBT	4-metil-dibenzotiofeno
4,6DEDBT	4,6-dietil-dibenzotiofeno
4,6DMDBT	4,6-dimetil-dibenzotiofeno
A	valor tabulado ecuación 4.17
Abs	Absorbancia
BDS	biodesulfuración
BSM	medio salino basal
$C_{\text{Cx-DBT}}$	concentración de Cx-DBT, ( $\mu\text{M}$ )
$C_{\text{O}_2}$	concentración de oxígeno, (%)
$C_{\text{O}_2}^*$	concentración de saturación de oxígeno, (%)
$C_s$	concentración de sustrato, ( $\mu\text{M}$ )
Cx	concentración de biomasa, ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$C_X^{\text{max}}$	concentración máxima de biomasa, ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Cx-DBT	alquil dibenzotiofeno
Cx-HBP	alquil hidroxibifenilo
DAD	díodo array
$D_{\text{BDS}}$	grado de desulfuración, ( $\%\cdot\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$D'_{\text{BDS}}$	capacidad de desulfuración específica, ( $\%\cdot\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ )
DBT	dibenzotiofeno
DBTO	dibenzotiofeno sulfóxido
DBTO <sub>2</sub>	dibenzotiofeno sulfona
Dd	diámetro de la zona de descenso, (mm)
Dr	diámetro de la zona de ascenso, (mm)
Ds	diámetro de salida, (mm)
E	factor de aumento
FMNH <sub>2</sub>	flavin mononucleótido reducido
HBP	2-hidroxibifenilo
HBPSi	hidroxibifenilbencenosulfinato
HBPSo	hidroxibifenilbencenosulfonato
HDS	hidrodesulfuración
HLB	balance hidrofílico/hidrofóbico

HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography) acoplado a detector Diodo Array.
Hr	altura de la zona de ascenso, (mm)
$K_{C_x-DBT}$	constante cinética de Cx-DBT, ( $\text{min}^{-1}$ )
$K_I$	constante de inhibición, ( $\mu\text{M}$ )
$K_L$	coeficiente de transferencia de materia
$K_{L,a}$	coeficiente volumétrico de transferencia en presencia de microorganismo, ( $\text{h}^{-1}$ )
$k_{L,a}$	coeficiente volumétrico de transferencia en ausencia de microorganismo, ( $\text{h}^{-1}$ )
$K_m$	constante de Michaelis-Menten, ( $\mu\text{M}$ )
$K_s$	constante de saturación, ( $\mu\text{M}$ )
LB	medio Luria Bertani
$m_{O_2}$	coeficiente de mantenimiento, ( $\text{mol O}_2/\text{g}_X \cdot \text{s}$ )
N	velocidad de agitación, (rpm)
NaDH	nicotinamida adenina dinucleótido
OUR	velocidad de consumo de oxígeno, ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
P	potencia suministrada en condiciones de aireación, (W)
$P_{HBP}$	concentración de inhibición de HBP, ( $\mu\text{M}$ )
Qa	caudal de aireación, ( $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$q_{O_2}$	velocidad específica de consumo de oxígeno, ( $\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
S	concentración de sustrato, ( $\mu\text{M}$ )
$S_{C_x-DBT}$	velocidad de Cx-DBT, ( $\mu\text{M}$ )
SDS	dodecil sulfato sódico
$S_{HBP}$	concentración de HBP, ( $\mu\text{M}$ )
$S_{HBPS}$	concentración de HBPS, ( $\mu\text{M}$ )
$S_{DBT}$	concentración de DBT, ( $\mu\text{M}$ )
$S_{DBTO}$	concentración de DBTO, ( $\mu\text{M}$ )
$S_{DBTO_2}$	concentración de $\text{DBTO}_2$ , ( $\mu\text{M}$ )
SEM	espectroscopia electrónica de barrido
t	tiempo, (min)
TDG	tinción diferencial Gram
V	volumen del líquido, (L)
$X_{BDS}$	rendimiento de desulfuración de DBT, (%)

$X'_{\text{BDS}}$	rendimiento de desulfuración de DBT y de los intermedios de la ruta 4S, (%)
$Y_{\text{BDS}}$	rendimiento de conversión, (%)
$Y_{X/S}$	coeficiente de conversión
$Y_{\text{OX}}$	rendimiento macroscópico para crecimiento, ( $\text{molO}_2/\text{g}_{\text{biomasa}}$ )
$Y_{\text{OP}}$	rendimiento macroscópico para desulfuración, ( $\text{molO}_2/\text{g}_{\text{biomasa}}$ )

### **Letras Griegas**

$\gamma$	tensión superficial, ( $\text{mN/m}$ )
$\lambda$	longitud de onda, ( $\text{nm}$ )
$\mu_{\text{max}}$	velocidad específica de crecimiento, ( $\text{h}^{-1}$ )
$v$	velocidad específica de consumo de sustrato, ( $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$ )
$v'$	velocidad lineal del fluido, ( $\text{W}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$v_{\text{CxDBT}}$	velocidad de volumétrica de Cx-DBT, ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )
$v_{\text{max}}$	velocidad máxima de consumo de sustrato, ( $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ min}$ )
$v_0$	velocidad inicial de desaparición, ( $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{min}$ )

### **Subíndices**

exp	experimental
i	intermedio
ter	teórico
max	máximo
x	biomasa

<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>277</b>
---------------------------------------	------------

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

Abbad-Andaloussi S., Lagnel C., Warzywoda M., Monot F., 2003. Multicriteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds. *Enz. Microbiol. Technol.*, 32(3-4), 446-454.

Afferder van M., Schacht S., Klein J., Trüper H.G., 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp., D.O. *Arch. Microbiol.*, 153, 324-328.

Alcon A., Martin A.B., Santos V.E., Gomez E., Garcia-Ochoa F., 2008. Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CEC5279. *Bioch. Engin. J.*, 39(3), 486-495.

Alcon A., Santos V.E., Martin A.B., Yustos P., Garcia-Ochoa F., 2005. Bidesulfurization of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Bioch. Engin. J.*, 26, 168-175.

Armstrong S.M., Sankey B.M., Voordouw G., 1995. Conversion of dibenzothiophene to biphenyl by sulfate reducing bacteria isolated from oil field production facilities. *Biotechnolo. Lett.*, 17, 1133-1136.

Bailey J.M., Ollis D.F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Ed. McGraw-Hill International Editions. ISBN: 0-07-Y66601-6.

Bandaiphet C., Prasertsan P., 2006. Effect of aeration and agitation rates and scale up on oxygen transfer coefficient,  $K_La$  in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydr. Polym.*, 66, 216-228.

Boltes K., Caro A., Leton P., Rodriguez A., García-Calvo E., 2008. Gas-liquid mass transfer in oil-water emulsions with an airlift bio-reactor. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(12), 2408-2412.

Brunet S., Mey D., Pérot G., Bouchy C., Diehl F., 2005. On the hydrosulfurization of FCC gasoline: a review. *Applied Catalysis*, 278, 143-172.

Calik P., Yilgör P., Ayhan P., Demir A.S., 2004. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chem. Eng. Sci.*, 59, 5075-5083.

Caro A., Boltes K., Leton P., García-Calvo E., 2007. Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria. *Biochemical Engineering J.*, 35(2), 191-197.

Caro A., Leton P., García-Calvo E., Leonardo Setti, 2007. Enhancement of dibenzothiophene biodesulfurization using  $\beta$ -cyclodextrins in oil-to-water media. *Fuel*, 86(16), 2632-2636.

Caro A., Boltes K., Leton P., García-Calvo E., 2008. Biodesulfurization of dibenzothiophene by growing cells of *Pseudomonas putida* CEC5279 in biphasic media. *Chemosphere*, 73(5), 663-669.

Caro A., Boltes K., Leton P., García-Calvo E., 2008. Description of by-product inhibition effects on biodesulfurization of dibenzothiophene in biphasic media. *Biodegradation*, 19, 599-611.

Castorema G., Suárez C., Valdez I., Amador G., Fernández L., Le Borge S., 2002. Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by newly isolated *Rhodococcus* sp. strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 10640, 1-5.

Chen H., Zhang W-J., Chen J-M., Cai Y-B., Li W., 2007. Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6DMDBT by *Micobacterium* sp. ZD19. *Bioresource Technol.*, 99, 3630-3634.

Churchill P.F., Dudley R.J., Churchill S.A., 1996. Surfact-enhanced bioremediation. *Waste management*, 15(5-6), 371-377.

Constati M., Giralt J., Bordons A., 1996. Desulfurization of dibenzothiophene by bacteria. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 10, 510-516.

- Constati M.,Giralt J., Bordons A., 1994. Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other compounds by *Agrobacterium* MC501 and a mixed culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 214-219.
- Dahlberg M.D., Rohrer R.L., Fauth D.J., Sprecher R., Olson G.J., 1993. Biodesulfurization of dibenzothiophene sulfone by *Anthrobacter* sp. and studies with Illinois No. 6 coal. *Fuel.*, **72**, 1645-1649.
- De Castro C., Lanzetta R., Molinaro A., Parilli M., Piscopo V., 2001. Acetyl substitution of the O-specific polysaccharide caryophyllan from the phenol phase of *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli*. *Carbohydrate Research*, 335, 205-211.
- Déziel, E.,Comeau Y.,Villemur R., 1999. Two liquid-phase biorreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation*, 10, 219-233.
- Dhanasekharan K.M., Sanyal J.,Jain A., Haidari A., 2005. A generalized approach to model oxygen transfer in bioreactors using population balances and computational fluid dynamics. *Chem. Eng. Sci.*,60, 213-218.
- Doran P.M., 1998. Principios de la Ingeniería de los Bioprocesos. Ed. Acribia S.A. ISBN: 84-200-0853-2.
- Dudley M.W., Frost J.W.,1994. Biocatalytic desulfurization of arylsulfonates. 1994.*Bioorg., Med. Chem.*, 2,681-690.
- Dumont V., Oliviero L., Maugé F., Houalla M., 2007. Oxidation of dibenzothiophene by a metal-oxygen-aldehyde system. *Catalysis Today*, 130, 195-198.
- Dussap C.G., Decorps J., Gros J.B.,1985. Transfert d'oxygène en présence de polysaccharides exocellulaires dans un fermenteur agité aéré et dans un fermenteur de type gazosiphon. *Entropie*, 123, 11-20.
- Figueredo L.M.,Calderbank P.H.,1979. The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates.*Chem. Eng. Sci.*, 34, 1333-1338.



Folsom B.R., Schieche D.R., DiGracia P.M., Werner J., Palmer S.,1999. Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erthropolis* I-19. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov, 4967-4972.

Fulzele D., Heble M.R., Rao P.S.,1995. Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor. *J. Biotechnol.*, 40(2),139-142.

Galaction A., Cascaval D., Oniscu C., Turnea M.,2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochem. Eng. J.*, 20, 85-94.

Galan B., Díaz E., García J.L., 2000. Enhancing desulfurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ. Microbiol.*, 2, 687-694.

Galan B., Díaz E., Fernandez A., Prieto M.A., García J.L., García-Ochoa F., García-Calvo E., 2001. Method for desulfurization of dibenzothiophene using a recombinant *Pseudomonas putida* strains as biocatalyst. International Patent WO 01/70996 AL.

Gallagher J.R., Olson E.S., Stemly D.C., 1993. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107, 31-36.

Gallardo M.E., Ferrandez A., De Lorenzo V., Garcia J.L., Diaz E., 1997. Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance desulfurization. *J. Bacteriol.*, 179, 7156-7160.

García-Ochoa F., Gómez E., Santos V.E., 2000a. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 680-690.

García-Ochoa F., Gómez E., 2004. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.*, 59 (12), 2489-2501.

García-Ochoa F., Gómez E., 2005. Prediction of gas-liquid mass transfer in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 92, 761-772.

García-Ochoa F., Gómez E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Advanced*, 27, 153-176.

García-Ochoa F., 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.*, 49 (3), 289-307.

Gary J.R., Handweck, G.E., 1994. Introduction to petroleum refining. Marcel Dekker, N.K.

Gilbert S.C., Morton J., Buchanan S., Oldfield C., McRoberts A., 1998. Isolation of a unique benzothiophene- desulphurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulphurization pathway. *Microbiology*, 144, 2545-2553.

Gómez E., Santos V.E., Alcon A., García-Ochoa F., 2006. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: Effect on growth and BDS capability. *Chem. Eng. Sci.*, 61, 4595-4604.

Goubin S., Huaiying Z., Jianmin X., Guo C., Wangliang L., Huizhou L., 2006. Biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture. *Biochem. Eng. J.*, 27(3), 305-309.

Gray K.A., Pogrebinsky O.S., Mrachko T., Xi L., Monticello D.J., Squires C.H., 1996. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1705-1709.

Grossman M.J., Lee M.K., Prince R.C., Minak-Bernero V., George G.N., Pickering I.J., 2001. Deep desulfurization of extensively hydrodesulfurized middle distillate oil of *Rhodococcus* sp. strain ECRD-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1949-1952.

Guardia M.J., García-Calvo E., 2000. Characterization of bioreaction processes: Aerobic *Escherichia coli* cultures. *J. of Biotechnol.*, 84(2), 107-118.

Guardia M.J., García-Calvo E., 2001. Modeling of *Escherichia coli* growth and acetate formation under different operational conditions. *Enzyme and Microbial Technol.*, 24 (6-7), 449-455.

Guchhait S., Biswas D., Bhattacharya P., Chowdhury R., 2005A. Biodesulfurization of model organo-sulfur compounds and hydrotreated diesel experiments and modelling. *Chem. Eng. J.*, 112, 145-151.

Guchhait S., Biswas D., Bhattacharya P., Chowdhury R., 2005B. Bi-phasic bioconversion of sulfur present in model organo-sulfur compounds and hydro-treated diesel. *Catal. today*, 112(1-3), 145-151.

Gunam I., Yaku Y., Hirano M., Yamamura K., Tomita F., Sone T., Asano K., 2006. *J. of Bioscience and Bioeng.*, 4, 322-327.

H. del Olmo C., Alcon A., Santos V.E., García-Ochoa F., 2005A. Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalysts for DBT biodesulfurization: Influence of media composition. *Enz. Microbiol. Technol.*, 37,157-166.

H. del Olmo C., Santos V.E., Alcon A., García-Ochoa F., 2005B. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalysts for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.*, 22, 229-237.

Harwell J.H., Sabatini D.A, Knox R.C., 1999. Surfactants for ground water remedation. *Colloids Surf. A.*, 151, 255-268.

Herbst H., Shumpe A., Deckwer W.D.,1992. Xanthan production in stirred tank fermenters: oxygen transfer and scale-up. *Chem. Eng. Technol.*, 15, 425-434.

Hirasawa K., Ishii Y., Kobayashi M., Koizumi K., Maruhashi K.,2001. Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,65, 239-246.

Honda H., Sugiyama H., Saito I., Kobayashi T., 1998. High cell density cultura of *Rhodococcus rhodochrous* by pH-stat feeding and dibenzothipohene degradation. *J. Ferment. Bioeng.*, 85(3), 334-338.

Itsihara A., Duegmil F., Lee J., Mitsuhashi K., Qian E.W., Kabe T., Hydrodesulfurization of sulfur-containing polyaromatic compounds in light gas oil using noble metal catalysts. *Applied catalysis*, 289, 163-173.

Izumi Y., Ohshiro T., Ogino H., Hine Y., Shima M., 1994. Selective desulfurization of dibenzothipohene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(1), 223-226.

Izumi Y., Ohshiro T., 2001. Purification and characterization of enzymes involved in desulfurization of dibenzothipohene in fossil fuels. *J. Molec. Catal. B.: Enzymatic.*, 11, 1061-1064.

Jem K.J. 1989. Scale down techniques for fermentation. *BioPharm*, 3, 30-39.

Jia X., Wen J., Sun Z., Caiyin Q., Xie S., 2006. Modeling of DBT biodegradation behaviors by resting cells of *Gordonia* sp. WQ-01 and its mutant in oil-water dispersions. *Chem. Eng. Sci.*, 61(6), 1987-2000.

Junker B.H., 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia Coli* and yeast fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (6), 347-364.

Kabe T., Aoyama Y., Wang D., Ishihara A., Quian W., Hosoya M., Zhang Q., 2001. Effects of H<sub>2</sub>S on hydrodesulfurization of dibenzothiophene and 4,6-dimethyldibenzothiophene on alumina-supported NiMo and NiW catalysts. *Appl. Catal. A-Gen.*, 209, 237-247.

Kachlany S., Levery B., Kim J.S., Reuhs B.L., Lion L.W., Ghiorse W.G., 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.*, 3, 774-784.

Kaufmann E.N., Harkins J.B., Rodriguez Jr M., Tsouris C., Selvaraj P.T., Murphy S., 1997. Development of an electro-spray bioreactor for crude oil processing. *Fuel Process Technol.*, 52, 127-134.

Kauffman E.N., Harkins J.B., Borole A.P., 1998. Comparison of batch-stirred and electrospray reactors for biodesulfurization of dibenzothipohene in crude oil and hydrocarbon feedstocks. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 73, 127-144.

Boltes K., Caro A., Leton P., Rodríguez A., García-Calvo E., 2008. Gas-liquid mass transfer in oil-water emulsions with an airlift bio-reactor. *Chem. Eng. and Processing: Process Intensification*, 47( 12), 2408-2412.

Kawase Y., Moo-Young M., 1988. Volumetric mass transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with Newtonian and No-Newtonian media. *Chem. Eng. Res. Dev.*, 66, 284-288.

Kieran P.M., Malone D.M., MacLoughin P.M., 2000. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. On: Influence of stress on cell growth and product formation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 67, 139-177.

Kilbane J.J. II, 1990. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources. Conservation and Recycling*, 3, 69-79.

Kilbane J.J., 1992. Mutant microorganism useful for cleavage of organic C-S bonds. U.S. Patent 5104801.

Kilbane J.J. II, 2006. Microbial biocatalyst development to upgrade fossil fuels. *Curr. Op. in Biotechnol.*, 17, 1-10.

Kim, I.S., Park J., Kim K., 2001. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon using nonionic surfactants in soil slurry. *Appl. Geochem.*, 16, 14179-1428.

Kishimoto M., Inui M., Omasa T., Katakura Y., Suga K., Okumura K., 2000. Efficient production of desulfurizing cells with the aid of expert system. *Biochem. Eng. J.*, 5, 143-147.

Kobayashi M., Onaka T., Konishi J., Takaki M., Okada H., Ohta Y., Koizumi K., Suzuki M., 2000. Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 187, 123-126.

Kobayashi M., Onaka T., Horiuchi K., Yoshikawa O., Hirasawa K., Ishii Y., Fujino K., Sugiyawa H., Maruhashi K., 2001. Kinetic analysis of microbial desulfurization of model and light gas oils containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (2), 298-304.

Kodama K., Nakatani S., Umehara K., Shimizu K., Minoda Y., Yamada K., 1970. Stoichiometry, part III. Isolation and identification of products from dibenzothiophene. *Agric. Biol. Chem.*, 34, 1320-1324.

Kodama K., Umehara K., Shimizu K., Nakatani S., Minoda Y., Yamada K., 1973. Identification bacterial growth on substituted thiophenes of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 45-50.

Kobayashi M., Onaka T., Ishii Y., Konishi J., Takaki M., Okada H., Ohta Y., Koizumi K., Suzuki M., 2000. Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strain. *FEMS Microbiology Letters*, 187, 123-126.

Kobayashi M., Horiuchi K., Yoshikawa O., Hirasawa K., Ishii Y., Fujino K., Sugiyama H., Maruhashi K., 2001. Kinetic analysis of microbial desulfurization of model and light gas oils containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (2), 298-304.

Konishi J., Ishii Y., Onaka T., Okumura K., Suzuki M., 1997. Thermophilic carbon-sulphur bond targeted biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3164-3169.

Konishi M., Kishimoto M., Tamesui N., Omasa T., Shioya S., Ohtake H., 2005A. Effect of sulfur sources on specific desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 in exponential fed-batch culture. *J. Of Biosci. And Bioeng.*, 99(3), 259-263.

Komives C.F., Lilley E., Russell A.J., 1994. Biodegradation of opesticides in nonionic water-in-oil microemulsions of Tween 85: Relationship between micelle structure and activity. *Biotech. And Bioeng.*, 43,946-959.

Konishi M., Kishimoto M., Tamesui N., Omasa T., Shioya S., Ohtake H., 2005B. The separation of oil from an oil-water-bacteria mixture using a hydrophobic tubular membrane. *Biochem. Eng. J.*, 24, 49-54.

Kropp K.G., Fredorak P.M., 1998. A rewiev of the occurrence, toxicity and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. *Can. J. Microbiol.*, 44, 605-622.

Le Borgne S., Quintero R., 2003. Biotechnological process for the refining of petroleum. *Fuel Process Technol.*, 81, 155-169.

Lee M.K., Senius J.D., Grossman M.J., 1995. Sulfur specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4362-4366.

Li F., Feng J., Meng L., Zheng Y., Luo L., Ma C., 2005. Microbial desulfurization of gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B immobilized-cell system. *Applied and Environ. Microl.*, 71(1), 276-281.

Liu Y.S., Wu J.Y., Ho K-p., 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on Phaffia rhodozyma growth and caretoid production in shake-flask cultures. *Biochem. Eng. J.*, 27, 331-335.

Liz M.Z., Squires C.H., Monticello D.J., Childs J.D., 1996. Genetic analysis of the *dsz* promoter and associated regulatory regions of Rhodococcus erythropolis IGTS8. *J. Bacteriol.*, 178, 6409-6418.

Lizama H.M., Wilkins L.A., Scott T.C., 1995. Dibenzothiophene sulfur can serve as sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 17, 113-116.

- Lu J., Nakajima-Kambe T., Shigeno T., Ohbo A., Nomura N., Nakahara T., 1999. Biodegradation of dibenzothiophene and 4,6-Dimethyldibenzothiophene by *Sphingomonas paucimobilis* strain TSZ-7. *J. of Biocience and Bioeng.*, 88(3), 293-299.
- Luo M.F., Xing J.M., Gou Z.X., Li S., Liu H.Z., Chen J.Y., 2002. Desulfurization of dibenzothiophene of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane. *Biochem. Eng. J.*, 13(1), 1-6.
- Maghsoudi S., Kheirrolomoom A., Vossoughi M., Tanaka E., Katoh S., 2000. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Conerybacterium* sp. strain P32C1. *Biochem. Eng. J.*, 5, 11-16.
- Maghsoudi S., Vossoughi M., Kreirrolomoom A., Tanaka E., Katoh S., 2001. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem. Eng.J.*, 8, 151-156.
- Marcelis C.L.M., Leeuwen M. van, Polderman H.G., Janssen A.J.H., Lettinga G., 2003. Model description of dibenzothiophene mass transfer in oil/water dispersions with respect to biodesulfurization. *Biochem. Eng. J.*, 16, 253-264.
- Margaritis A., Zajic J.E., 1978. Biotechnology review: mixing, mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 939-1001.
- Martín A.B., Alcon A., Santos V.E., García-Ochoa F., 2005. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulphurization: Influence of the operational conditions. *Biochem. Eng. J.*, 22, 229-237.
- Matsui T., Hirasawa K., Konishi J., Tanaka Y., Maruhashi K., Kurane R., 2001. Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophene and alkylated benzothiophene by recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 196-200.
- Mc Farland B.L., Boron D.J., Deever W., Meyer J.A., Johnson A.R., Atlas R.M., 1998. Biocatalytic sulfur removal from fuels: applicability for producing low sulfur gasoline. *Crit. Rev. in Microbiol.*, 24(2), 99-147.



Mezcua M., Fernández-Alba A., Rodríguez A., Boltes K., Leton P., García-Calvo E., 2007. Chromatographic methods applied in the monitoring of biodesulfurization process-State of the art. *Talanta*, 73(1), 103-114.

Mezcua M., Fernández-Alba A., Boltes K., Alonso del Águila R., Leton P., Rodríguez A., García-Calvo E., 2008. Determination of PASHs by various analytical techniques based on gas chromatography-mass spectrometry. Application to a biodesulfurization process. *Talanta*, 75 (5), 1158-1166.

Merchuk J.C., 1989. In *Advances in Biotechnology* (Fiechter A., Ed.) Vol. 20, Springer-Verlag.

Merchuk J.C., 1990. Why use air-lift bioreactors?. *Trends of Biotechnology*, 8, 66-71.

Merchuk J.C., Asenjo J.A., 1994. Fundamentals of bioreactors design. *Bioreactors System Design*: Asenjo J.A., Merchuk J.C., Eds.; Plenum Press: New York, 191-193.

Micheletti M., Barret T., Doig S.D., Baganz F., Levy M.S., Woodley J.M., 2006. Fluid mixing in shaken bioreactors: Implications for scale-up predictions from microliter-scale microbial and mammalian cell cultures. *Chem. Eng. Sci.*, 61, 2939-2949.

Monticello D.J., Finnerty W.R., 1985. Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 750-760.

Monticello D.J., 1998. Riding the fossil fuel desulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Op. in Microbiol.*, 11, 540-546.

Monticello D.J., 2000. Biodesulfurization and the up-grading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 540-546.

Mullighan N.C., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.

- Nekodzuka S., Toshiaki N., Nakajima-Kambe T., Nobura N., Lu J., Nakamara Y., 1997. Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Micobacterium* strain G3. *Biocatalysis Biotransformation* , 15, 21-27.
- Noda K., Watanabe K., Maruhashi K., 2003. Isolation of a recombinant desulfurizing 4,6-dipropyl dibenzothiophene in *n*-tetradecane. *J. of Bioscience and Bioeng.*, 4, 354-360.
- Nedeltchev S., Ookawara S., Ogawa K., 1999. A fundamental approach to bubble column scale up based on quality of mixedness. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 32, 431-439.
- Nojiri T., Suzuki K., Izumi Y., 2001. Regulation of dibenzothiophene degrading of aromatic compounds via angular dioxygenation. *J.Gen. Appl. Microbiol.*, 279-305.
- Nomura N., Takada M., Okada H., Shinohara Y., Nakajima-Kambe T., Ankara T., Uchiyama H., 2005. Identification and fuctional analysis of genes requiered for desulfurization of alkyl dibenzothiophenes of *Mycobacterium* sp. G3. *J. of Bioscience and Bioeng.*, 4, 398-402.
- Nunn D., Bonde S.E., 2003. Technical Progress Report for The Biocatalytic Desulfurization Project. DOE Award Number: DE-FC26-02NT15340.
- Oda S., Ohta H., 2002. Biodesulfurizatin of dibenzothiophene with *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 and its mutant in an interfase bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.*, 94(5), 474-477.
- Okada H., Nomura N., Nakahara T., Sayito K., Uchiyama H., Maruhashi K., 2003. Analyses of microbial desulfurization reaction of alkylalted dibenzothiophenes dissolved in oil phase. *J.Biosci. Bioeng.*, 100, 489-497.
- Oldfield C., Pogrebinsky O., Simmonds J., Olson E.S., Kulpa C.F., 1997. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiol.*, 143, 2961-2973.

Oldfield C., Wood N.T., Gilbert S.C., Murray F.D., Faure F.R., 1998. Desulfurization of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomicete organisms belonging to the genus *Rhodococcus* and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74, 119-132.

Oldshue JY, 1966.. Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnol. Bioeng.*, VIII; 3-24.

Olson E., Stanley D., Gallagher J., 1993. Characterization of intermediates in the microbial desulfurization of dibenzothiophene. *Energy fuels*, 7, 159-164.

Onaka T., Kobayashi M., Ishii Y., Okumura K., Suzuki M., 2000. Application of solid-phase extraction to the analysis of the isomers generated in biodesulfurization against methylated dibenzothiophenes. *J. of Chromatography A.*, 903, 193-202.

Onaka T., Konishi J., Ishii Y., Maruhashi K., 2001. Desulfurization characteristics of thermophilic *Paenibacillus* sp. strain A11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes. *J. Bioscience and Bioeng.*, 2, 193-196.

Onaka T., Kobayashi M., Ishii Y., Konishi J., Maruhashi K., 2001. Selective cleavage of the two C-S bonds in asymmetrically alkylated dibenzothiophenes by *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1. *J. Bioscience and Bioeng.*, 1, 80-82.

Omori T., Monna L., Saiki Y., Kodama T., 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Conerybacterium* sp. strain SY-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 911-915.

Oshiro T., Hine Y., Izumi Y., 1994. Enzymatic desulfurization of dibenzothiophene by a cell-free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 341-344.

Oshiro T., Hirata T., Hashimoto I., Izumi Y., 1996A. Characterization of DBT desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon. *J. Ferment. Bioeng.*, 82(6), 610-612.

Oshiro T., Suzuki K., Izumi Y., 1999B. Regulation of Dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 81(2), 121-124.

Ohshiro T., Izumi Y., 1999. A microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1),1-9.

Ohshiro T., Ishii Y., Matsubara T., Ueda K., Izumi Y., Kina K., Kirimura K., 2005. DBT desulfurizing enzymes from moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B: purification, characterization and overexpression. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(3), 266-273.

Onbasli D., Aslim B., 2009. Effects of some organic pullulants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by *Pseudomonas* spp. strains. *Journal of Harzardous Materials*, 168(1), 64-67.

Oyama, S.T., 2003. Novel catalysts for advanced hydroprocessing: transition metal phosphides. *Journal of. Cataysis.*, 216, 343-352.

Pacheco M.A., Lange E.A., Pienkos P.T., Yu L.Q., Rouse M.P., Lin Q., Linguist L.K., 1999. Recent advances in biodesuñlfurization of diesel fuel. NPRA AM-99-27. National Petrochemical and Refiners Association, Annual Meeting, March 21-23; San Antonio, Texas.1-26.

Parsec M.R., Tolker-Nielsen, 2008. Pattern formation in *Pseudomonas aueruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiol.*, 11, 560-566.

Pedersen A.G., Andersen H., Nielsen J., Villadsen J., 1994. A novel technique based on Kr-85 for quantification of gas-liquid mass transfer in bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*,6, 803-810.

Rall H.T., Thompson C.J., Coleman H.J.,Hopkins R.L., 1972. In: Bulletin 659, Sulfur compounds in crude oil, U.S. Dept. Of Interior, Bureau of Mines.

Rashidi L., Moheballi G., Towfighi J., Rasekh B.,2006. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its alkylated derivatives through the sulfur-specific pathway by the bacterium *RIP1-S81*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (4), 351-356.

Rasthtchi M., Mohebal G.H., Akbarnejad M., Towfighi J., Rasekh B., Keytash A., 2006. Analysis of biodesulfurization of model oil system by the bacterium, strain RIPI-22. *Biochem. Eng. J.*, 29(3), 169-173.

Reiling H.E., Thanei-Wyss U., Guerra- Santos L., Hirt R., Käpeli O., Fiechter A., 1986. Pilot plant production of Rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environ. Microbiol.*, 51 (5), 985-989.

Rhee S.K., Chang J.H., Chang Y.K., Chang H.N., 1998. Desulfurization of dibenzothipohene and diesel oils by a newly isolated Gordona strain CYKS1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2337-2331.

Robinson W.R.A.M., Van Veen J.A.R., De Beer V.H.J., Van Santen R.A., 1999. Development of deep hydrodesulfurization catalyts II. NiW, Pt and Pd catalyts tested with (substituted ) dibenzothipophene. *Fuel Process Technol.*, 61, 89-101.

Sato H., Clark D.P., 1995. Degradation of dibenzothipohene sulphoxide and sulphone by *Antrobacter* strain DBTS2. *Microbios.*, 83, 145-159.

Sanchez O.F., Almeciga-Díaz C.J., Silva E., Cruz J.C., Valderrama J.D., Caicedo L.A., 2008. Reduction of sulfur levels in Kerosene by *Pseudomonas sp.* strain in airlift reactor. *Latin American Applied Research*, 38(4), 329-335.

Schilling B.M., Alvares L.M., Wang D.I.C., Cooney C.L., 2002. Continuous desulfurization of DBT wity *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968). *Biotechnol. Prog.*, 18, 1207-1213.

Schlenk D., Bevers R.J., Vertino A.M., Cerniglia C.E., 1994. P450 catalyzed S-oxidation of dibenzothiopheneby *Cunninghamella elegans*. *Xenobiotica*, 24, 1077-1083.

Setti L., Lanzarini G., Pifferi P.G., 1994. Diffusion as a rate controlling step in heavy-oli biodesulfurization processes. *Fuel Process Technol.*, 40, 311-317.

Setti L., Lanzarini G., Pifferi P.G., 1997. Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process. *Fuel Process Technol.*, 52, 145-153.

Setti L., Farinelli P., Di Martino S., Frassinetti S., Lanzarini G., Pifferi P.G., 1999A. Developments in destructive and non-destructive pathways for selective desulfurizations in oil-biorefining processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 111-117.

Setti L., Mazzieri S., Pifferi P.G., 1999B. Enhanced degradation of heavy oil in aqueous system by a *Pseudomonas* sp. in the presence of natural and synthetic sorbents. *Biosource Technol.*, 67, 191-199.

Setti L., Boloni S., Badiali E., Giuliani S., 2003. Inverse phase transfer biocatalysis for a biodesulfurization process of a middle distillates. *BECTH.MOCK.YT-TA.CEP. 2.XHMR.*, 44(1), 80-83.

Seymour D.T., Verbeek A.G., Hrudey S.E., Fedorak P.M., 1997. Acute toxicity and aqueous solubility of some condensed thiophenes and their microbial metabolites. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 658-665.

Solemaini M., Bassi A., Margaritis A., 2007. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotech. Advances*, 25, 570-596.

Shavandin M., Sadeghizadeh M., Zomorodipour A., Khajeh K., 2008. Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Bioresource Technology*, 100, 475-479.

Sudhamani S.R., Tharanathan R.N., Prasad M.S., 2004. Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. *Carbohydrate Polymers*, 56, 423-427.

Shukla V.B., Kulkarni P.R., Pandit A.B., 2001. Scale up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, 8, 19-29.

Speight, J.C., 1981. The desulfurization of heavy oils and residues. Hienz Hienemann, ed. Marcel Dekker, N.K.

Takada M., Nomura N., Okada H., Nakajima-Kambe T., Nakahara T., Uchiyama H., 2005. De-repression and comparison of oil-water separation activity of the dibenzothiophene desulfurizing bacterium, *Mycobacterium* sp.G3. *Biotechnol. Lett.*, 27, 871-874.

Trilli A.,1986. Scale-up fermentation , p.277-307.*In* Demain, A.L. and Solomon, N.A.(ed), Manual of industrial microbiology and biotechnology.American Society for Microbiology, Washington, D.C..

Tsai T.T., Kao C.M., Yhe T.H., Liang S.H., Chien H.Y., 2009. Application of surfactant enhanced permanganate oxidation and biodegradation of trichloroethylene in groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 111-119.

Vasconcelos J.M.T, Alves S.S., Nienow A.W., Bujalski W., 1998. Scale-up of mixing in gassed multiturbine agitate vessels. *Can J. Chem. Eng.*,76, 398-403.

Van Brunt J., 1985. Scale-up: the next hurdle.*Bio/Technology*,3,419-423.

Van Hamme J.D., Ward O.P., 2001. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. *Applied Environmental Microbiology*, 67(10), 4874-4879.

Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P., 2006. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24(6), 604-620.

Votruba J., Sobotka M.,1992. Physiological similarity and bioreactor scale-up. *Folia Microbiol.*,37, 331-345.

Ward R.J., C. de Oliveira A.H., Bortoleto R.K., Rosa J.C., Faça V.M., Greene L.J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49–Phospholipase A<sub>2</sub> homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 134-140.

- Wang P., Krawiec S., 1994. Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl. *Arch. Microbiol.*, 161, 266-271.
- Wang P., Humphrey A.E., Krawiec S., 1996. Kinetic analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8), 3066-3068.
- Watkins L.M., Rodriguez R., Schneider D., Broderick R., Cruz M., Chambers R., Ruckman, E., Cody M., Mrachko G.T., 2003. Purification and characterization of the aromatic desulfinase, 2-(2'-hydroxyphenyl)benzenesulfinate desulfinate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 415, 14-23.
- Watanabe K., Noda K., Ohta Y., Maruhashi, 2002. Desulfurization of light gas oil by a novel recombinant strain from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Letters*, 24, 897-903.
- Wong J.W.C., Fang M., Zhao Z., Xing B., 2004. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Environ. Qual.*, 33, 2015-2025.
- Xu P., Yu B., Li F.L., Cai X.F., Ma C.Q., 2006. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. *Trends Microbiol.*, 14, 398-405.
- Yamada K.O., Morimoto M., Tani Y., 2001. Degradation of dibenzothiophene by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of only nitrogen gas. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 91-93.
- Yan H., Kishimoto M., Omasa T., Katakura Y., Suga K., Okumura K., Yoshikawa O., 2000. Increase in desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 using ethanol feeding. *J. Biosci. Bioeng.*, 89(4), 361-366.
- Yang J.D., Wang N.S., 1992. Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. *Biotechnol. Prog.*, 8, 244-251.



Yang J., Marison I.W., 2005. Two-stage process design for the biodesulphurization of a model diesel by a newly isolated *Rhodococcus globellus* DAQ3. *Biochem. Eng. J.*, 27, 77-82.

Young T.B., 1979. Fermentation scale-up: industrial experience with a total environmental approach. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 326, 165-180.

Yu B., Ma C.Q., Zhou J., Wang X.F., Tao F., Zhang M.Y., 2006. Microbial desulfurization of gasoline by free cell whole cells of *Rhodococcus erythropolis* XP. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 258-284.

Yu B., Xu P., Shi Q., Ma C.Q., 2006. Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 54-58.

ZoBell C.E., 1953. Process for removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus. U.S. patent, 2641564.